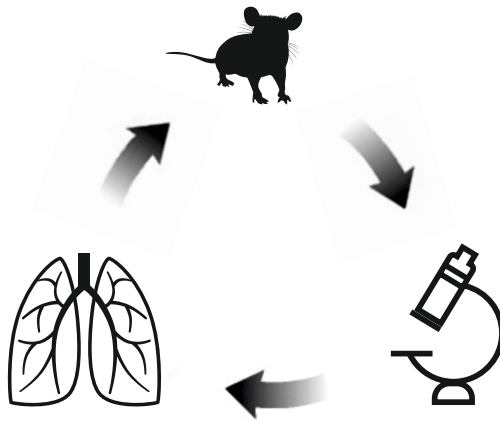


Einfluss von veränderten pH-Werten auf die Partikeltransportgeschwindigkeit und Zilienschlag- frequenz des Trachealepithels der Maus

Johannes Reichwein



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Einfluss von veränderten pH-Werten auf
die Partikeltransportgeschwindigkeit
und Zilienschlagfrequenz des
Trachealepithels der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Johannes Reichwein

aus Darmstadt

Gießen 2016

Aus dem medizinischen Zentrum Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie
Klinik Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Chefarzt Prof. Dr. med. Michael Sander

Betreuer: Prof. Dr. med. Michael Henrich D. Phil.

Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang Kummer

Tag der Disputation: 02.05.2017

Meiner Mutter gewidmet

Erklärung

Erklärung zur Dissertation:

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Inhalt

VORWORT	1
1 EINLEITUNG	1
1.1 DAS RESPIRATORISCHE EPITHEL.....	1
1.1.1 AUFGABEN DES RESPIRATORISCHEN EPITHELs	1
1.1.2 DER ANATOMISCHE AUFBAU DES TRACHEALEPITHELs DER MAUS	2
1.1.3 LOKALISATION UND FUNKTION DES KINOZILIUMS.....	3
1.1.4 AUFBAU UND URSPRUNG DER ZILIE.....	4
1.1.5 ABLAUF, KOORDINATION UND GESCHWINDIGKEITSREGULATION DES ZILIENSCHLAGS	5
1.2 pH-WERT UND pH-WERTREGULATIONS-MÖGLICHKEITEN DER ZELLE UND DEREN ORGANELLEN.....	7
1.2.1 DER pH-WERT IM INNEREN DER ZELLE	7
1.2.2 MECHANISMEN DER pH-REGULATION DES ZYTOSOLS	9
1.2.3 MECHANISMEN DER pH-REGULATION DES ZELLKERNS.....	14
1.2.4 MECHANISMEN DER pH-REGULATION DER SEKRETORISCHEN UND ENDOZYTOTISCH AKTIVEN ZELLORGANELLEN	14
1.2.5 MECHANISMEN DER pH-REGULATION DER MITOCHONDRIEN.....	15
1.2.6 MECHANISMEN DER pH-REGULATION DER PEROXISOMEN	16
1.2.7 AUSWIRKUNG VERSCHIEDENER pH-WERTE AUF ZILIENTRAGENDES EPITHEL AUßERHALB DER ATEMWEGE	16
1.2.8 AUSWIRKUNG VERSCHIEDENER pH-WERTE AUF DAS RESPIRATORISCHE EPITHEL	18
1.3 ZIELE UND FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT.....	20
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 VERSUCHSTIERE UND PRÄPARATION DER TRACHEA	21
2.2 VERSUCHSVORBEREITUNG UND MESSUNG VON PARTIKELTRANSPORTGESCHWINDIGKEIT UND ZILIENSCHLAGFREQUENZ.....	22

2.2.1	VERSUCHSVORBEREITUNG	22
2.2.2	DURCHFÜHRUNG UND AUFNAHME DES PARTIKELTRANSPORTES	24
2.2.3	AUSWERTUNG DES PARTIKELTRANSPORTES	25
2.2.4	DURCHFÜHRUNG UND AUFNAHME DER ZILIENSCHLAGFREQUENZ.....	27
2.2.5	AUSWERTUNG DER ZILIENSCHLAGFREQUENZ.....	27
2.3	VERSUCHE	29
2.3.1	VERSUCHSBEGINN.....	29
2.3.2	KALIBRIERUNG DER MICRO-PERFUSIONS-PUMPE	29
2.3.3	AUSWIRKUNGEN DES PUMPVORGANGS UND VERÄNDERTER pH-WERTE AUF DEN PARTIKELTRANSPORT UND DIE ZILIENSCHLAGFREQUENZ	31
2.3.4	EINFLUSS DES PUFFERWECHSELS AUF pH-WERTE IM BEREICH VON 5,0– 8,0 UND WIEDEREINSTELLUNG DES PHYSIOLOGISCHEN START-pH-WERTES AUF DIE PARTIKELTRANSPORTGESCHWINDIGKEIT	32
2.3.5	DIE INHIBITOREN AMILORID UND DiDs	33
2.3.6	EINFLUSS VON AMILORIDZUGABE AUF DIE PARTIKELTRANSPORTGESCHWINDIGKEIT BEI pH-WERT 5,0 UND 7,4.....	34
2.3.7	AUSWIRKUNGEN DER IONENAUSTAUSCHERINHIBITION DURCH DiDs UND AMILORID AUF DIE ZILIENSCHLAGFREQUENZ	36
2.4	AUSWERTUNG UND STATISTIK.....	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	EFFEKTE DES AUSTAUSCHS DER PUFFERLÖSUNG AUF DEN PARTIKELTRANSPORT UND DIE ZILIENSCHLAGFREQUENZ.....	39
3.2	pH 5,0–8,0 UND WIEDEREINSTELLUNG AUF pH 7,4 UND DAMIT VERBUNDENE AUSWIRKUNGEN AUF DIE PARTIKELTRANSPORTGESCHWINDIGKEIT	41
3.3	EFFEKTE VERSCHIEDENER pH-WERTE AUF DIE PARTIKELTRANSPORTGESCHWINDIGKEIT.....	45
3.4	EINFLUSS AZIDER ODER ALKALISCHER pH-WERTE AUF DIE ZILIENSCHLAGFREQUENZ	46
3.5	PUFFERWECHSEL AUF pH-WERT 6,0 UND 8,0 UND DER EFFEKT AUF DIE PARTIKELTRANSPORTGESCHWINDIGKEIT.....	48

3.6	EFFEKTE DER HEMMUNG VON PROTONENAUSTAUSCHERN AUF DIE ZILIENSCHLAGFREQUENZ	52
3.7	EFFEKTE UND REVERSIBILITÄT DER INHIBITION DES NATRIUM-KANALS BEI PH 5,0 UND PH 7,4 AUF DIE PARTIKELTRANSPORTGESCHWINDIGKEIT	54
3.8	EFFEKTE DER INHIBITION DER PROTONENAUSTAUSCHER AUF DIE ZILIENSCHLAGFREQUENZ BEI ZUSATZ VON NH ₄ CL.....	59
4	DISKUSSION.....	63
4.1	EINFLUSS DES pH-WERTES AUF DIE ZILIENSCHLAGFREQUENZ UND DIE PARTIKELTRANSPORTGESCHWINDIGKEIT DES RESPIRATORISCHEN EPITHEL DER TRACHEA VON MÄUSEN	63
4.2	pH-WERT BEEINFLUSSENDE UNTERSUCHUNGEN AN INTAKTEN TRACHEALEPITHELIEN	63
4.3	EFFEKTE VON pH-WERTVERÄNDERUNGEN AUF PARTIKELTRANSPORTGESCHWINDIGKEIT UND ZILIENSCHLAGFREQUENZ.....	68
4.4	KLINISCHER BEZUG.....	73
4.5	AUSBLICK	74
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	76
6	SUMMARY	77
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	78
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	81
9	LITERATURVERZEICHNIS	83
10	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	96
11	DANKSAGUNG.....	97

Vorwort

Die Arbeit wurde im experimentellen Labor der Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie mit dem ärztlichen Direktor Prof. Dr. med. M. A. Weigand in dem Zeitraum von Dezember 2010 bis Dezember 2012 durchgeführt.

1 Einleitung

1.1 Das respiratorische Epithel

1.1.1 Aufgaben des respiratorischen Epithels

Abhängig von Körpergröße und physischer Belastung werden die Atemwege des Menschen innerhalb von 24 Stunden von ca. 1000 bis 20000 Liter Umgebungsluft durchflutet. Da bei diesem Prozess gleichzeitig Fremdkörper wie Staub und Rußpartikel oder auch Viren und Bakterien eingeatmet werden können, benötigen die Trachea und die unteren Atemwege Systeme, um sich vor den schädlichen Substanzen zu schützen. Ein Sekret, welches das Epithel der Trachea bedeckt, bildet eine widerstandsfähige mechanische Barriere. Dieses Trachealsekret besteht aus zwei Phasen, einer periziliären Flüssigkeit und dem darüber liegendem Mukusfilm. Die hochvisköse Mukusschicht besteht zu einem Großteil aus Wasser (ca. 98%), Salz (1%) und glykosilierten Mucin-Proteinen [1]. Bei der periziliären Flüssigkeit, welche eine niedrigvisköse Lösung ist, wird vermutet, dass sie durch osmotische Vorgänge entsteht [2]. Beide Schichten besitzen zum einen die Eigenschaft körperfremde Noxen zu umschließen und festzuhalten [3]. Zum anderen hindert es Schadstoffe nicht nur an der Migration durch das Trachealepithel, sondern auch noch an der Adhäsion an dieses Epithel. Diese Eigenschaft kommt einer biologischen Barriere gleich, welche inflammatorischen Prozessen entgegen wirkt. Damit der Organismus sich von den mit Trachealsekret umschlossenen Partikeln befreien kann, ist ein ununterbrochener, Zilienschlag vermittelter, Abtransport notwendig. Die erfolgreiche

Exozytose ist bedingt durch die zilienbesetzten Zellen und deren koordinierte und zeitlich versetzte Abfolge von Schlägen, wodurch eine Wellenbewegung entsteht. Dieser gesamte Vorgang wird mukoziliäre Clearance genannt [3]. Ein wichtiges Kriterium für die Güte der Clearance ist neben der Schlagfrequenz die Anzahl der Zilien pro Zelle, die Anzahl dieser Zellen und die Länge der Zilien [4].

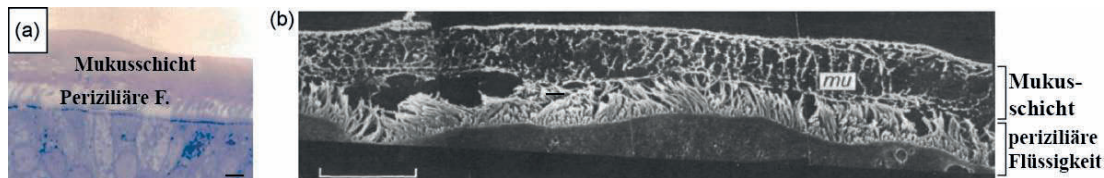


Abb. 1.1 (a) Lichtmikroskopisches Bild von Epithelzellen mit abgrenzbarer periziliärer Flüssigkeit und Mukusschicht, Maßstabsbalken = 5 μm [5] Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Verlages

(b) Elektronenmikroskopisches Bild von Epithelzellen mit periziliärer Flüssigkeit und Mukusschicht, Maßstabsbalken = 10 μm [6] Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Verlages, (Modifiziert von J. Reichwein)

1.1.2 Der anatomische Aufbau des Trachealepithels der Maus

Histologisch betrachtet stellt sich das respiratorische Epithel der Trachea der Maus als ein hochprismatisches mehrreihiges Flimmerepithel dar [7]. Es ist aus mehreren verschiedenen, histologisch unterschiedlichen Zelltypen aufgebaut. Die zilientragende Zelle kommt dabei mit ca. 50% am häufigsten vor [8]. Des Weiteren finden sich noch sekretorische Zellen, Bürstenzellen, Becherzellen und Basalzellen [7], [8]. Abgesehen von den Basalzellen erreichen die übrigen Zellen das Lumen der Trachea. Apikal weist die zilientragende Zelle zahlreiche Kinozilien auf. Dieser Zelltyp sitzt der Basalmembran breit auf [8]. Neben den Kinozilien finden sich an der apikalen Seite eine Vielzahl von Mikrovilli, die wie die Kinozilien ins Lumen hervorragen [7], [9]. Alle weiteren Zellarten zählen zu der Gruppe der nicht-zilientragenden Zellen. Ein häufiger, inhomogener Zelltyp der Gruppe der sekretorischen Zellen sind die Clara-like-Zellen. In ihrem Zytoplasma kommen neben großen Mengen an glattem endoplasmatischem Retikulum noch viele große Vesikel vor. Ihr Name kommt von der, histologisch gesehen, großen Ähnlichkeit mit sekretorisch aktiven Clara-Zellen [10], [11]. Aufgrund ihrer jeweiligen Morphologie,

vor allem bezüglich der Unterschiede der sekretorischen Vesikel, können die Clara-Zellen in drei Subtypen unterteilt werden. Mitunter kommen Zellen vor, die sich in einer Übergangsphase zwischen zilientragend, schleimbildend und Clara-like befinden. Somit kann vermutet werden, dass die Clara-Zellen eine Rolle bei der Zellmauserung des respiratorischen Epithels spielen [11]. Außerdem wichtig für den Zellaustausch sind die pluripotenten Basalzellen. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich in andere Zelltypen des Epithels der Trachea ausdifferenzieren können [12]. Des Weiteren kommen im respiratorischen Epithel noch schlanke Zellen ohne Zilien vor, die neuroendokrinen Zellen. Im Zytoplasma dieses Zelltyps befinden sich viele Granula mit elektronendichtem Inhalt [13]. Diese Zellen können isoliert, aber auch in Gruppen vorkommen. Beim Vorliegen in Gruppen werden sie als neuroepitheliale Körper bezeichnet [14]. Zusätzlich findet man im Epithel der Atemwege sogenannte solitäre chemosensorische Zellen (SCC). Sie sind über den gesamten Atemtrakt von nasal bis in die Bronchioli reichend verteilt. Zum einen dienen sie als Sinneszellen zum Schmecken und Riechen [15]. Außerdem wird vermutet, dass diese Zellen aufgrund ihrer chemosensorischen Eigenschaft Veränderungen des pH-Wertes, der CO₂-Konzentration und der Feuchtigkeit registrieren können [16].

1.1.3 Lokalisation und Funktion des Kinoziliums

Bei Zilien lassen sich zunächst die beweglichen (motilen) von den unbeweglichen (primären) unterscheiden. Diese Zellfortsätze sind ca. 2–10 µm lang, 250 nm dick, polar angeordnet und von einer Zytoplasmamembran umgeben. Die primären Zilien, welche auch die Bezeichnung Monozilien tragen, sind im gesamten Tierreich in vielen Organen und Geweben vorhanden. Ebenso sind sie an epithelialen, aber auch nicht-epithelialen Zellen vorzufinden, u.a. Chondrozyten, Fibroblasten oder Neuronen [17]. Während den Monozilien aufgrund ihrer Bewegungslosigkeit lange Zeit keine Funktion zugeordnet wurde, sind mittlerweile sensorische Fähigkeiten bekannt [18]. Die motilen Zilien finden sich in nahezu allen Lebewesen. Häufig sind sie auf Epithelien zu finden. Neben dem respiratorischen Epithel der oberen und unteren Atemwege findet man sie bei Mensch, Maus und Ratte auch noch in der Tuba uterina und bei Spermien.

1.1.4 Aufbau und Ursprung der Zilie

Menschliche Kinozilien haben eine Länge von ca. 6–7 μm und einen Durchmesser von ca. 0,2–0,3 μm [19]. Die Grundstruktur der Kinozilien besteht aus neun Mikrotubulipaaren, die als Doubletten bezeichnet werden (Abb. 1.2). Jede dieser Doubletten besteht aus einem A- und einem B-Tubulus. Eine Verbindung der einzelnen Doubletten miteinander wird durch Proteinbrücken (Nexine) gewährleistet. Im Zentrum der Kinozilien befinden sich zwei vollständig geschlossene, von einer zentralen Scheide umgebene, Mikrotubuliringe. Um diese zentral gelegene Einheit ordnen sich die neun Doubletten an. Die Verbindung der einzelnen Doubletten zum Zentrum wird dabei durch radiale Speichen gewährleistet. Eine weitere Verbindung zwischen den benachbarten Doubletten besteht durch Dynein, einem ATP-spaltendem Protein, welches die A- und B-Mikrofibrillen miteinander verbindet. Es existiert sowohl ein innerer als auch ein äußerer Dyneinarm. Aufgebaut sind die Arme aus Polypeptidketten von unterschiedlicher Größe. Aufgrund dessen werden schwere (400–500 kDA), mittlere (45–110 kDA) und leichte (8–55 kDA) Polypeptidketten unterschieden [20]. Der Zilienschlag kommt durch gleitende Bewegungen zwischen den Mikrotubuli zustande. Die Mikrotubulibewegungen entstehen durch Spaltung von ATP. An der Basis der Kinozilien findet man anstatt der neun Doubletten neun Triplets, welche durch einen weiteren unvollständigen Mikrotubulusring gekennzeichnet sind. Die neun Triplets jeder Kinozilie gehen dann in Basalknötchen (Kinetosomen) über. Hier enden auch die zwei zentralen Mikrotubuliringe. Es existieren aber auch Varianten von Kinozilien, in denen die Mikrotubuliringe in der Mitte fehlen. Bei den motilen Zilien wird der Aufbau mit 9+2, bei den primären mit 9+0 bezeichnet. Es werden jedoch auch bewegliche 9+0-Varianten und sensorische 9+2-Varianten beschrieben [20].

Die Struktur der Zilien in eukaryoten Zellen ist in vielen tierischen Lebewesen sehr ähnlich [20]. Es gibt zwei Hypothesen bezüglich ihres Ursprungs. Eine symbiontische evolutionäre Vergangenheit mit Bakterien, aus deren Organellen und Zellbestandteilen im Laufe der Evolution feste Bestandteile der prokaryoten Zelle geworden sind, beschreibt die Endosymbiontentheorie [21]. Eine autogene Spezialisierung des Zytoskeletts der Zilien wird in einer weiteren Theorie diskutiert [22].

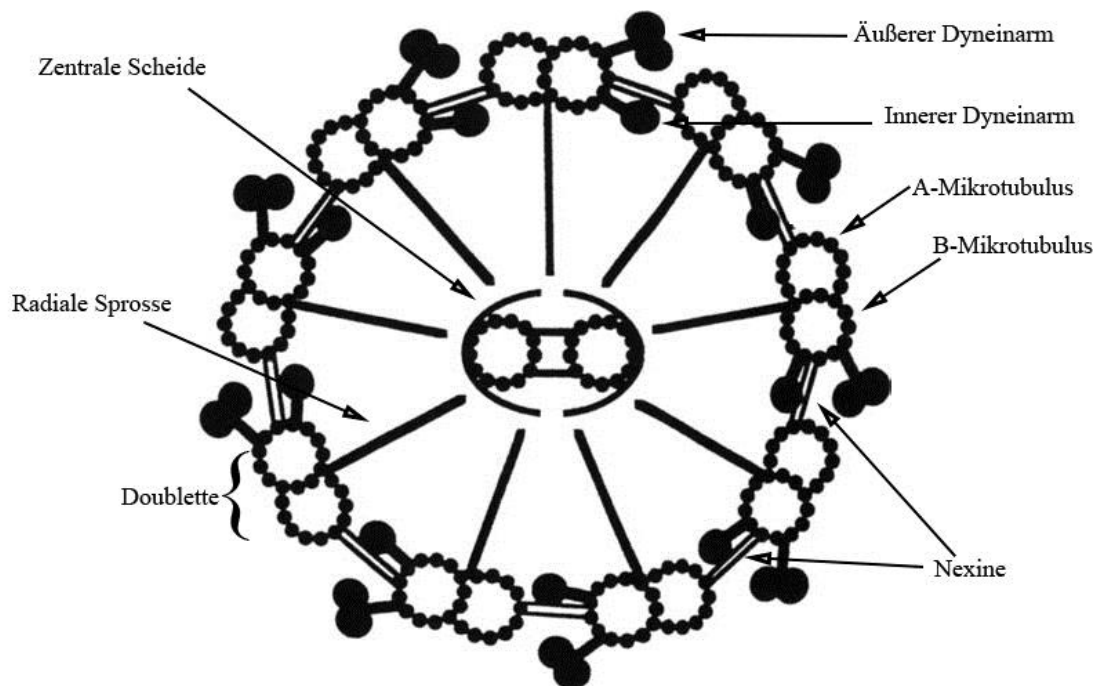


Abb. 1.2 Schematische Darstellung eines Querschnitts eines motilen Ziliums ohne umgebende Plasmamembran [3] Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Verlages Zilien zeichnen sich durch den sogenannten "9+2"-Aufbau aus. Dieser setzt sich aus 9 peripheren Tubulin-Doppelröhren zusammen, welche um 2 zentral gelegene Einzelröhren angeordnet sind. An den peripheren Tubuli sind die radial ausgerichteten Speichen sowie die inneren und äußeren Dyneinarme verankert. Die äußeren und inneren Dyneinarme sind Proteinkomplexe und bestehen aus verschiedenen Dyneinketten und assoziierten Proteinen. (Modifiziert von J. Reichwein)

1.1.5 Ablauf, Koordination und Geschwindigkeitsregulation des Zilienschlags

Der Bewegungsablauf der Kinozilien des Trachealepithels lässt sich in drei Phasen einteilen. Am Anfang steht der effektive Zilienschlag, diesem schließt sich eine Ruhephase an, die darauf folgende Rückstellphase bringt die Kinozilie zurück in ihre Ausgangsstellung. Ausschlaggebend für eine suffiziente mukoziliäre Clearance und den damit verbundenen Partikeltransport ist der effektive Zilienschlag. Diese Anfangsbewegung läuft zwei- bis dreimal schneller ab als die Rückstellbewegung [6]. Unter Normalbedingungen beschreibt die voll ausgestreckte Zilie einen Bogen von 110 Grad zur Epitheloberfläche. Sie taucht dabei ca. 0,5 µm tief in den Mukusfilm ein [23]. Dabei werden die im Mukus fixierten Partikel Richtung

Kehlkopf transportiert. Daran schließt sich eine Ruhephase an. In der nachfolgenden Rückstellphase beschreibt die Zilie einen zur Seite weichenden Bogen von 180 Grad. Der Kontakt zur Mukusschicht ist dabei nicht mehr gegeben [3]. Eine Zunahme der Geschwindigkeit der Schlagfrequenz geht mit einer Verkürzung aller drei Bewegungsphasen einher. Am stärksten verkürzen sich dabei die Ruhe- und die Rückstellungsphase [24]. Bei genauerer Betrachtung der Schlagmuster der Zilien stellt sich heraus, dass die Beugung und Änderung der Form von den inneren Dyneinarmen abhängt, während die Schlagfrequenz durch die äußeren Dyneinarme beeinflusst wird [25], [26]. Die Switch-Point-Theorie, die die verschiedenen Bewegungen der Zilie zu erklären versucht, geht davon aus, dass während der effektiven Schlagbewegung die eine Hälfte der Dyneinärmchen beteiligt ist, bei der Rückstellbewegung aber die andere Hälfte aktiv ist [27]. In welche Richtung der effektive Schlag einer Zilie geht, hängt von der einheitlichen Ausrichtung der Basalkörperchen ab. Das schmale Ende zeigt dabei in die effektive Schlagrichtung [28]. Wenn die Basalkörperchen benachbarter Zellen identisch ausgerichtet sind, besteht die Möglichkeit eine einheitliche Transportrichtung über größere Strecken zu erreichen. Neben einer strukturierten Transportrichtung ist eine zeitliche Koordination der Zilienbewegungen für die Clearance essentiell. Die Koordination erfolgt als Metachronie, einer Form von koordinierter Aktivität, wobei die Schläge einer Zilie durchweg asynchron mit den umgebenden Zilien sind [23]. Dadurch entstehen die zeitlich versetzten ziliären wellenförmigen Bewegungen in der Trachea. Ein gleichgerichteter, synchronisierter und koordinierter Bewegungsablauf kommt dadurch zustande, dass die Zilien einer Zelle mit den Zilien einer anderen benachbarten Zelle in Kontakt kommen [29]. In einem weiteren Model konnte aber auch gezeigt werden, dass noch andere Mechanismen für den geregelten Ablauf der mukoziliären Clearance existieren, da es auch Zilien gibt, die nicht mit den Zilien benachbarter Zellen in Kontakt stehen, ein koordinierter Zilienschlag aber dennoch gegeben ist [30].

Auch bei der Geschwindigkeitsregulation des Zilienschlags spielen viele verschiedene Kriterien eine Rolle. Dazu zählen unter anderem Temperatur, Luftfeuchtigkeit [31] und der pH-Wert [32]. Des Weiteren kann eine Vielzahl von Substanzen die Zilienschlagfrequenz (ZSF) und damit mitunter die Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) verändern. Die Beeinflussung der

Geschwindigkeit verläuft rezeptorvermittelt. Über intrazelluläre Botenstoffe (second messenger) werden Signalkaskaden aktiviert, die über zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und Kalzium (Ca^{2+}) die Frequenz erhöhen können. cAMP erhöht dabei durch eine Proteinkinase A den Zilienschlag. Im Vergleich dazu steigert cGMP durch eine Proteinkinase G und evtl. Proteinkinase A die Frequenz. Kalzium steigert die ZSF unabhängig von Proteinkinasen. Einen negativen Einfluss auf die Frequenz der Schläge besitzt die kalziumabhängige Proteinkinase C, durch welche es zu einer Reduktion der Geschwindigkeit kommt [19], [3].

1.2 pH-Wert und pH-Wertregulationsmöglichkeiten der Zelle und deren Organellen

1.2.1 Der pH-Wert im inneren der Zelle

Die Regulation eines physiologischen extrazellulären pH-Wertes im Bereich von 7,35–7,45 ist ebenso lebensnotwendig wie die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes von 7,2. Nahezu alle Proteine benötigen für die Aufrechterhaltung ihrer Struktur und Funktion einen bestimmten pH-Wert [33]. Der Protonengradient der Zelle ermöglicht es Energie zu generieren und zu konvertieren [34].

Aufgrund der enormen Wichtigkeit des pH-Wertes verfügt die Zelle über eine Vielzahl von Puffersystemen zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes. Die einzelnen Kompartimente und Bestandteile der Zelle sind in der Lage schnelle, lokale pH-Schwankungen durch ihre jeweilige Pufferkapazität auszugleichen und den benötigten pH-Wert stabil zu halten. Die totale Pufferkapazität (β_{total}) setzt sich dabei aus den beiden Teilen $\beta_{\text{intrinsic}}$ und $\beta_{\text{HCO}_3^-}$ zusammen. $\beta_{\text{intrinsic}}$ basiert auf verschiedenen intrazellulären schwachen Säuren und Basen, ergänzt wird die intrinsische Pufferkapazität noch durch Seitenketten von Aminosäuren sowie Phosphat-Gruppen [35]. Während $\beta_{\text{intrinsic}}$ vergleichsweise niedrig bei physiologischen pH-Werten ist (10–20 mM bei pH 7,2), so ist eine starke Erhöhung bei erheblichen pH-Wertänderungen zu erkennen (40 mM bei pH 6,4) [36]. Um die

pH-Schwankungen optimal ausgleichen zu können muss die zweite Komponente, βHCO_3^- , aktiv sein. Aufgrund der Tatsache, dass die Zellen von Säugetieren kontinuierlichen Kontakt mit CO_2 haben, welches ungeladen ist und die Zellmembran passieren kann [37], wird zur Pufferung, durch die Hydratation von CO_2 und der anschließenden Deprotonierung von CO_2 , Bikarbonat (HCO_3^-) produziert. Bei einem CO_2 -Partialdruck von ca. 37 mmHg kann davon ausgegangen werden, dass βHCO_3^- ca. 29 mM zur Gesamtpufferkapazität bei einem pH von 7,1 beiträgt [34].

Bei Auftreten einer lang anhaltenden Azidose oder Alkalose reicht die Kombination aus $\beta_{\text{intrinsic}}$ und βHCO_3^- nicht aus. Das Nichtvorhandensein anderer regulatorischer Prozesse, der permanente Anfall von metabolischen Säure-Äquivalenten in Verbindung mit dem andauernden Transport von Ionen, wie beispielsweise H^+ , OH^- oder HCO_3^- würde die beschriebenen passiven Puffer schnell erschöpfen. Um doch eine ausgeglichene Homöostase erreichen zu können existieren für jedes Kompartiment der Zelle individuelle, dynamische, stabile Puffersysteme [34].

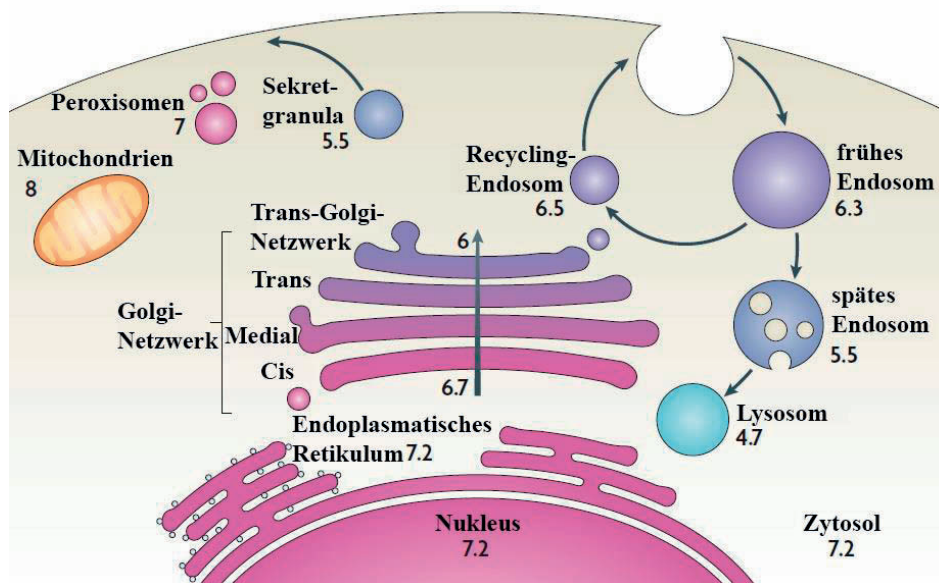


Abb. 1.3 *pH-Werte unterschiedlicher subzellulärer Kompartimente* [34] Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Verlages

Die pH-Werte wurden von verschiedenen Quellen gesammelt. Der mitochondriale pH-Wert bezieht sich auf die Mitochondrienmatrix, genauer die innere Membran. Der pH-Wert in den frühen Endosomen wurde während des Prozesses der Sortierung der Endosomen im endosomalen Kompartiment bestimmt. Der pH-Wert der multivesikulären späten Endosomen bezieht sich auf die luminalen Flüssigkeit. Der pH-Wert der Flüssigkeit im Inneren der Vesikel kann schwanken. (Modifiziert von J. Reichwein)

1.2.2 Mechanismen der pH-Regulation des Zytosols

Im extrazellulären Raum ist der pH-Wert unter Normalbedingungen mit 7,3–7,4 leicht alkalisch. Im Vergleich zum extrazellulären Milieu ist der pH-Wert im Zytosol der Zelle mit 7,2 leicht azid. Ein Grund, warum der zytosolische pH-Wert ins Saure tendiert, ist die Aufrechterhaltung des elektrischen Membranpotentials. Da das Zellinnere negativ geladen ist, kommt es zur Aufnahme von positiv geladenen Protonen wie H^+ und zur Abgabe von negativ geladenen Teilchen wie HCO_3^- . Die jeweiligen Transportvorgänge werden durch energieabhängige Protonenpumpen gewährleistet. Ein anderer Grund ist, dass durch Stoffwechselvorgänge wie beispielsweise der ATP-Produktion im Zytoplasma durch Glykolyse oder der oxidativen Phosphorylierung im Mitochondrium saure Abbauprodukte entstehen. Glykolyse und oxidative Phosphorylierung liefern besonders bei Muskelaktivität und der durch Pathogene verursachten Aktivierung von Leukozyten notwendige Energie [38]. Um einen Überschuss an Protonen zu vermeiden, müssen diese kontinuierlich vom Zytosol über die Plasmamembran nach außen transportiert werden. Dieser Vorgang wird durch eine Vielzahl von Protonenpumpen und Ionenaustauschern, die die dafür benötigte Energie direkt oder indirekt durch ATP beziehen, ermöglicht. Die eigentlichen ATPasen, die beispielsweise in Parietalzellen des Magens oder im distalen Tubulus der Niere vorkommen, spielen in der pH-Regulation eine untergeordnete Rolle. Ihre Hauptaufgabe besteht bei den genannten Parietal- und Tubuluszellen in der Bereitstellung von Protonen für das Lumen des Magens und der Tubuli [39] [40]. Folglich nehmen Protonen pumpende ATPasen bei den meisten Zellen der Säugetiere keine wichtige Stellung in der Regulation des zytosolischen pH-Wertes ein. Stattdessen werden Protonen, in den meisten Arten von Zellen, gegen den elektrochemischen Gradienten aus der Zelle transportiert, indem sie die entsprechenden Kanäle an andere Substrate gekoppelt (Antiporter wie beispielsweise Na^+/H^+ -Austauscher) oder durch Co-Transport (Symporter) passieren und so den pH-Wert maßgeblich beeinflussen [34].

Einer dieser Austauscher, der die Zelle vor aziden pH-Werten schützt, ist der Na^+/H^+ -Austauscher. Durch diese Kanäle strömen Natrium- oder Kalium-Protonen ein, während im Gegenzug Protonen aus der Zelle gepumpt werden. Es existieren

viele verschiedene Formen dieses Transportsystems, die Na^+/H^+ -Austauscher 1–9 (auch NHE1 bzw. SLC9A1–NHE9 bzw. SCL9A9 genannt) und die Na^+/H^+ -Antiporter 1–2 (ebenfalls unter NHEDC1–2 bekannt) [41], [42]. Dabei ist die NHE1-Isoform am ausführlichsten beschrieben und dient dadurch sehr gut zur Erklärung des Funktionsprinzips. Dieser Typ ist auf der Zelloberfläche der meisten Zellen exprimiert und ist hauptverantwortlich für die Aufrechterhaltung des zytosolischen pHs. NHE1 ist, wie auch die anderen Isotypen, Na^+ -selektiv und macht sich den ins Zellinnere gerichteten Na^+ -Gradient, welcher durch die Ausfuhr von Na^+ entsteht, zunutze [43], [44]. Aufgrund der Tatsache, dass das extrazelluläre Na^+ -Vorkommen ungefähr zehnmal größer ist als die zytosolische Na^+ -Konzentration, entsteht an der Zellmembran ein Gradient, wodurch NHE1, rein theoretisch, die Potenz besitzt, den pH-Wert des Zytosols um eine pH-Einheit in den alkalischen Bereich, im Vergleich zum Extrazellulärraum, zu verändern. Dennoch ist der Ruhe-pH-Wert im Zytosol niedriger als extrazellulär, da die Transporter bei einem physiologischen zytosolischen pH von 7,2 nur vermindert aktiv sind. Dieser Ruhezustand ist auf eine Einheit zurückzuführen, die den pH-Wert misst und reguliert. Sie wird als H^+ -Modifikator oder H^+ -Sensor bezeichnet [45]. Diese regulatorische Struktur hat zwei Hauptfunktionen. Zum einen hält sie den Na^+ -Gradient an der Zellmembran aufrecht, der für die einwandfreie Funktion von anderen Na^+ -gekoppelten Ionen und Nährstofftransportern notwendig ist. Zum anderen gleicht sie eine zu starke Alkalisierung des Zytoplasmas aus und gewährleistet so einen zytosolischen pH-Wert, welcher für die bestmögliche Funktion und Stabilität von Proteinen gebraucht wird. Im Gegenzug kommt es bei sich kontinuierlich erhöhender H^+ -Konzentration im Zytosol zu einer erheblichen Zunahme der Aktivität des Transporters, wodurch der Gefahr eines zu niedrigen pH-Wertes entgegengewirkt wird [43], [46].

Neben seiner Fähigkeit den zytosolischen pH-Wert zu messen, besitzt NHE1 die Eigenschaft seine interne pH-sensitive Struktur aufgrund von externen Signalen zu verändern. Dazu zählen unter anderem Hormone [47], Mitogene [48], [49] und physikalische Reize [50].

Ein weiterer Transporter ist der Laktat- H^+ -Co-Transporter. Dieser steuert die Transportvorgänge zwischen Monocarbonsäuren (vor allem Laktat) und Protonen [51]. Diese Art von Transporter spielt aber keine maßgebliche Rolle in der pH-

Regulation des Zytosols, da große Mengen an Laktat hauptsächlich unter anaeroben Stoffwechsellagen in Skelettmuskelzellen und soliden Tumoren anfallen. [52]

Eine weitere wichtige Rolle in der pH-Regulation spielen die Bikarbonat-Transporter, die zusätzlich saure Metabolite aus der Zelle ausschleusen. Die die Zellen von Säugetieren umgebende Konzentration von HCO_3^- beträgt ungefähr 25 mM. Die Zellen haben im Laufe der Evolution Systeme entwickelt HCO_3^- aufzunehmen und ihr Zytosol damit zu alkalisieren. Bei diesem Vorgang kommt es zur Dissoziation von HCO_3^- in CO_2 und Wasser. Während CO_2 aufgrund seiner kleinen Größe und neutralen Ladung die Zellmembran problemlos passieren kann, benötigt das größere, negativ-geladene Bikarbonat Transportproteine um die Zellmembran überwinden zu können [34]. Es existiert eine Vielzahl von HCO_3^- -Transportern. Unter ihnen spielen vor allem die Na^+ -gekoppelten $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter (NBC) eine wichtige Rolle. Diese Art der Transporter (NBCs), von denen es sechs verschiedene gibt, befördert Na^+ zusammen mit HCO_3^- ins Zellinnere. [53] Bei den verschiedenen Unterformen dieser Transporter kommt es durch stöchiometrische Unterschiede zu elektroneutralen und elektrogenen Isoformen. Bei den elektroneutralen Isoformen NBCn1 und NBCn2 erfolgt ein Cotransport von 1 Na^+ /1 HCO_3^- [53]. Bei den elektrogenen Varianten NBCe1 und NBCe2 werden 1 Na^+ /2 HCO_3^- bzw. 1 Na^+ /3 HCO_3^- transportiert [54]. Während bei den elektroneutralen Isoformen der Transport ausschließlich auf der Kombination der Na^+ - und HCO_3^- -Gradienten basiert, so ist bei den elektrogenen Transportern die Antriebskraft durch die negative innere Ladung der Zelle gegeben. Dies kommt dadurch zustande, dass es bei NBCn1 und NBCn2 durch die höhere extrazelluläre Konzentration von Na^+ zu einem gleichwertigen HCO_3^- Transport in die Zelle kommt, der äquivalent mit der Ausschleusung von Protonen ist. Bei NBCe1 und NBCe2 hingegen kommt es bei einem Überschreiten des Gradienten durch die elektrische Triebkraft zu einem vermehrten Ausstrom von HCO_3^- , was zu einer Azidifikation des Zytosols führt [34]. Ein Beispiel für das Funktionsprinzip von NBCe1 ist der Transport von Na^+ und HCO_3^- in das Blut über die basolaterale Seite von Zellen den proximalen Tubulus der Niere [55].

Obwohl, aufgrund der stetigen Generierung von Protonen durch Stoffwechselvorgänge, der Transport von sauren Metaboliten vom Zellinneren in den

Extrazellularraum durch Protonen-Austauscher gewährleistet sein muss, so finden sich in der Zellmembran auch Transportmechanismen, die Protonen in die Zelle einschleusen. Für die häufigste Form der Protonenaufnahme, Austausch Cl^- gegen HCO_3^- , sind vor allem zwei Anionenaustauscher (auch als AE1–AE3 oder SLC4A1–SLC4A3) verantwortlich. Dabei existieren sowohl elektroneutrale als auch eine elektrische Spannung erzeugende Typen [53]. Ein ins Zellinnere gerichteter Cl^- -Gradient entsteht durch das Konzentrationsgefälle von Cl^- , welches im Inneren eine niedrigere Konzentration als außen hat. Im Austausch wird HCO_3^- nach extrazellulär gepumpt. Der beschriebene Anionenaustauscher hat dabei vier Hauptfunktionen, die aus der Kontrolle des zytosolischen pH-Wertes, der Sekretion von sowohl Protonen als auch Basen und dem Transport von NaCl bestehen [34]. Die Feinabstimmung des pH-Wertes wird durch gleichzeitige Regulationsvorgänge der alkalisierenden, sowie der azidifizierenden Mechanismen im Zytosol aktiviert. Sollte der pH-Wert durch übermäßiges Ausschleusen von Säuren zu alkalisch werden, so kann dieser durch die Säure-ladenden Transporter schnell wieder ausgeglichen werden. Eine Überkompensation wird dabei durch innere Eigenschaften der Anionenaustauscher gewährleistet, da deren Transportaktivität sich bei einem pH-Wertabfall von 7,3 auf 6,8 um ca. 90% reduziert. Die sensorische Komponente ist dabei nicht direkt in den Anionenaustauschern zu finden. Stattdessen tragen transmembranöse Domänen und Reste der amino-terminalen zytoplasmatischen Domäne dazu bei, dass bei einem sauren zytoplasmatischen pH-Wert die Aktivität des AE2 gehemmt wird [56]. Durch das Zusammenspiel von AE2, der bei sauren pH-Werten inaktiviert wird, und NHE1, der durch Säuren aktiviert und bei alkalischen pH-Werten inaktiviert wird, pendelt sich der pH-Wert bei 7,2 ein.

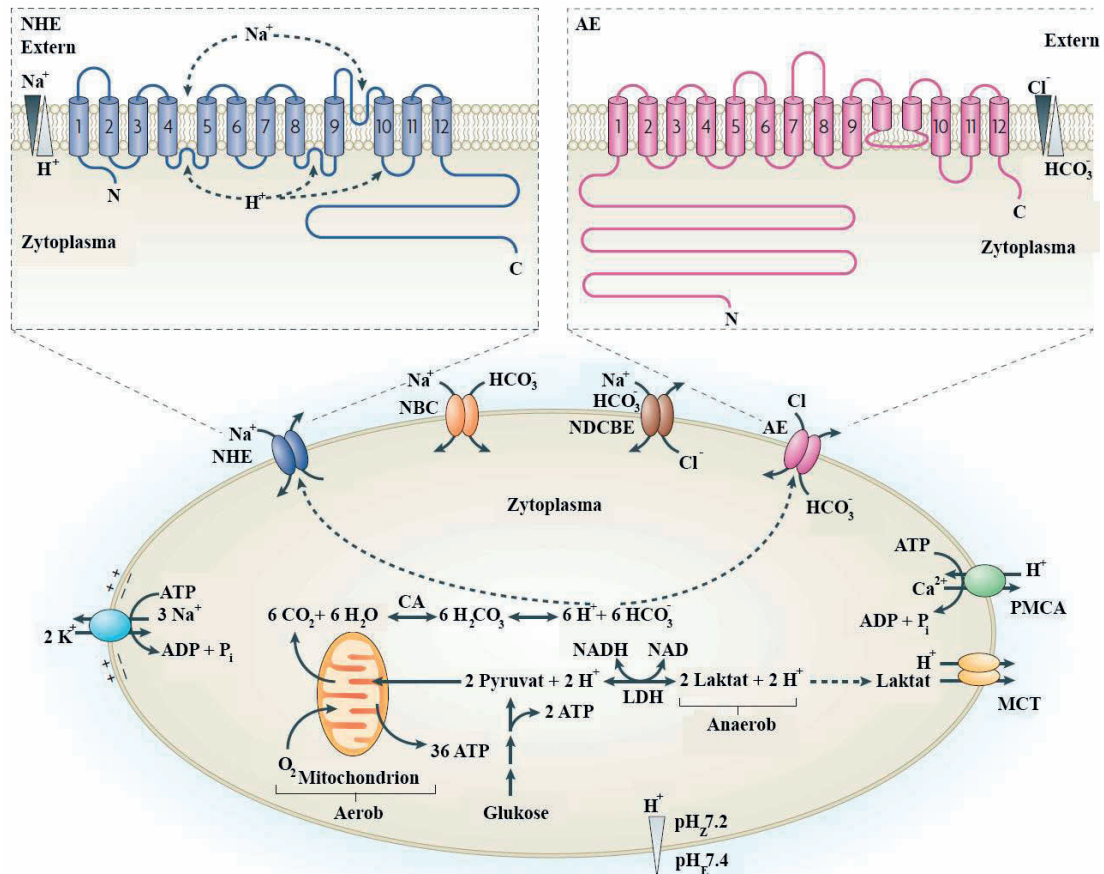


Abb. 1.4 Zytoplasmatische pH-Regulation über Ionen-Kanäle [34] Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Verlages

Das Zytoplasma tendiert zu aziden pH-Werten. Die niedrigen pH-Werte resultieren aus einer Vielzahl unterschiedlicher Stoffwechselwege, wie der Produktion von ATP im Zytoplasma über Glykolyse, wodurch Laktat entsteht (anaerobe Komponente), sowie der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, wodurch CO_2 (aerobe Komponente) anfällt. Die hauptsächlichen pH-regulatorischen Transporter, welche für die Alkalisierung verantwortlich sind, befinden sich in der Plasmamembran. Diese sind die Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) und die $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter (NBCs). Eine geringe Anzahl von Zelltypen alkalisieren ihr Zytosol durch die Aktivität von Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschern (NDCBEs). Diese Transporter nutzen die gespeicherte Energie, des einwärts gerichteten elektrochemischen Na^+ -Gradienten, der durch Na^+/K^+ -ATPasen (NKAs) entsteht. Diese alkalisierenden Mechanismen werden ausbalanciert durch die Aktivität von sich in der Plasmamembran befindenden $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - oder Anionen-Austauschern (AEs), welche die Zelle azidifizieren. Plasmamembranständige Ca^{2+} -ATPasen (PMCAs), welche zytosolisches Ca^{2+} gegen extrazelluläres H^+ austauschen, azidifizieren ebenfalls das Zytosol als Antwort auf Stimuli, die das intrazelluläre Ca^{2+} erhöhen. In Geweben, die einen anaeroben Metabolismus durchlaufen, kann Alkalisierung bevorzugt über Monocarboxylat/ H^+ -Cotransporter (MCTs, beispielsweise in Muskeln zu finden) erreicht werden. Die transmembrane Topologie von NHE und AE Proteinen ist in den vergrößerten Bildausschnitten dargestellt. CA - Carboanhydrase, LDH - Laktatdehydrogenase, pH_Z - zytosolischer pH, pH_E - extrazellulärer pH [34]. (Modifiziert von J. Reichwein)

1.2.3 Mechanismen der pH-Regulation des Zellkerns

Bei Betrachtung der den Zellkern umgebenden Membran lassen sich Poren erkennen, die einen Durchmesser von 4–9 nm aufweisen und somit von kleinen Proteinen passiert werden können [57]. Aufgrund dessen ist die Membran für H^+ -Ionen sehr einfach zu passieren und es ist anzunehmen, dass die gleichen Mechanismen, die den pH-Wert im Zytosol regulieren, auch für die Homöostase im Zellkern verantwortlich sind. Es besteht Grund zur Annahme, dass das Zytosol den pH-Wert des Zellkerns indirekt reguliert. Zu dieser Vermutung existieren aber noch keine wissenschaftlichen Arbeiten [34].

1.2.4 Mechanismen der pH-Regulation der sekretorischen und endozytotisch aktiven Zellorganellen

Um das Überleben der Zellen zu gewährleisten ist es von höchster Wichtigkeit, dass neu synthetisierte Glykoproteine und Lipide ihren vorgesehenen Bestimmungsort erreichen. Eine Methode, um diesen Vorgang zu ermöglichen, ist die Kontrolle der für den Transport verantwortlichen Proteine durch die Beeinflussung der Protonenladung und damit des pH-Wertes. Dabei sind die pH-Werte der jeweiligen Bestandteile des kompletten sekretorischen Systems untereinander unterschiedlich [58]. Der pH-Wert des endoplasmatischen Retikulums (ER) liegt bei ca. 7,2. Der des cis-Golgi-Apparats liegt bei ungefähr 6,7 und wird im Verlauf zum trans-Golgi-Netzwerk mit nahezu 6,0 noch azider. Den niedrigsten pH-Wert findet man bei den Sekretgranula mit 5,2.

Um Protonen ins Innere der jeweiligen Zellorganellen zu schleusen werden V-ATPasen benötigt. Diese Komplexe besitzen die Fähigkeit ATP aufzuspalten und so Energie für den Protonentransport bereitzustellen. Die Vielzahl von V-ATPasen-Isoformen erklärt teilweise die verschiedenen pH-Werte der einzelnen Kompartimente. Jedoch sind diese Variationen der V-ATPasen eher für Eigenschaften spezialisierter Zellen, wie säureproduzierender Osteoklasten oder Epithelien, verantwortlich [40]. Faktoren, die die pH-Variationen durch die V-ATPasen erklären können, sind die Dichte der Komplexe und deren Transportrate [59]. Die V-ATPasen transportieren H^+ in die Zellorganellen ohne dabei noch andere

Ionen mit einzuschleusen. Durch diesen Pumpvorgang entsteht eine Spannung auf der Membran, die einem weiteren Protoneneinstrom entgegenwirkt und dessen Ausfuhrate sogar steigert. Um dem Aufbau der elektrischen Spannung entgegenzuwirken, sind zum einen der Einstrom von Anionen (Cl^-) und zum anderen der Ausstrom von Kationen (K^+) notwendig. Des Weiteren müssen parallel zum H^+ -Einstrom neutralisierende Ionen mittransportiert werden. Um dies zu gewährleisten, existiert eine Vielzahl von Anionen-transportierenden Kanälen, die zur Homöostase beitragen [34]. Bei der Aufnahme von Stoffen in die Zelle wird deren pH-Wert bei ihrem Transport durch das endozytotische Netzwerk azidiert. Endozytotische Vesikel weisen dabei leicht azide pH-Werte auf, während die Lysosomen einen deutlich niedrigeren pH-Wert von 4,5–4,7 besitzen [60]. Der im Verlauf der Endozytose von Stoffen immer weiter abfallende pH-Wert spielt eine wichtige Rolle bei Phagozytose und Endozytose. Außerdem hat das azide Milieu noch Bedeutung bei der Aktivierung von Rezeptoren und Proteasen sowie weiteren essentiellen Reaktionen der Zelle. Unter anderem ist auch der Kontakt der Membranen der jeweiligen Zellorganellen der einzelnen endozytotisch aktiven Kompartimente abhängig von der intraluminal herrschenden Azidität [61]. Um einen niedrigen pH-Wert erzeugen zu können werden, wie beim sekretorischen System, V-ATPasen benötigt. Zusätzlich spielen Chloridkanäle bei der Homöostase der Endo- und Lysosomen [62], sowie CFTR für die Funktion der Phagosomen [63], eine Rolle.

1.2.5 Mechanismen der pH-Regulation der Mitochondrien

Beim Vergleich der pH-Werte der sekretorischen und endozytotisch aktiven Zellorganellen, die sich im aziden Bereich bewegen, fällt bei Betrachtung der Mitochondrien auf, dass deren pH-Wert mit 8,0 alkalisch eingestellt ist. Der Grund dafür ist, dass H^+ mit einer hohen Rate über die innere Membran nach außen transportiert werden [64], [65]. In Verbindung mit dem innenseitig negativen elektrischen Potential, welches durch den Protonenausstrom generiert wird, erzeugt der transmembranöse pH-Gradient einen Protonengradienten, welcher von der inneren Membran zur ATP-Gewinnung aus ADP und Phosphat genutzt wird. Der H^+ -Gradient reguliert des Weiteren die Na^+ , K^+ und Ca^{2+} Homöostase mithilfe von

Kationen- H^+ -Austausch, Na^+ - Ca^{2+} -Austausch und dem Einwärtstransport von Ca^{2+} [66], [67], [68].

1.2.6 Mechanismen der pH-Regulation der Peroxisomen

Die Peroxisomen stammen vom ER ab, von wo sie über eine Zwischenstufe als Vesikel zu den fertigen Zellorganellen heranreifen und wichtige Stoffwechselvorgänge der Zelle regeln [69], [70]. Zu ihren Aufgaben zählen die Aufspaltung von lang- und verzweigt-kettigen Fettsäuren über Beta-Oxidation, die Cholesterolsynthese, die Gallensäureproduktion, der Purinstoffwechsel, der Aminosäurestoffwechsel und die Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies [71]. Die Peroxisomen haben, wie das ER, kein intrinsisches Regulationssystem für die Homöostase des pH-Wertes. Es wird vermutet, dass sie pH-Schwankungen durch Säure- und Basentransporter und der Pufferkapazität des Zytoplasmas ausgleichen [34].

1.2.7 Auswirkung verschiedener pH-Werte auf zilienträgendes Epithel außerhalb der Atemwege

Mit Zilien besetzte Zellen finden sich neben den Luftwegen noch im Uterus, den Eileitern, den Ductuli efferentes in den Hoden und dem ventrikulären System des Gehirns [72]. Bei den Zilien in den Ductuli efferentes und dem cerebralen Ventrikelsystem handelt es sich um Stereozilien [73]. Des Weiteren ist die zur Fortbewegung benötigte Geißel des Spermiums, die den Zilien ähnlich ist, aus Mikrotubuli aufgebaut [74]. Bei Betrachtung des Zilienschlags in den jeweiligen Organen wurde die Frequenz bei organspezifischem, physiologischem pH-Wert gemessen. Im Urogenitaltrakt weiblicher Säugetiere herrschen keine einheitlichen pH-Werte. Der Wert der uterinen Flüssigkeit bewegt sich im Bereich von 7,0. Schwankungen sind abhängig vom Menstruationszyklus und erreichen mitunter Bereiche von 6,6–7,6 [75]. Beim Eisprung kommt es zu weiteren pH-Variationen in zunehmend azidere Bereiche [76]. Geschlechtsverkehr hingegen erhöht den pH-Wert der Flüssigkeit des Uterus um 0,2–0,95 für ca. 30 Minuten [75]. Der pH-Wert der

Flüssigkeit des Eileiters liegt mit 7,6–8 im alkalischen Bereich [77]. Die Schlagfrequenz der dortigen Zilien ist dabei unabhängig vom weiblichen Zyklus und variiert auch nicht in den unterschiedlichen anatomischen Abschnitten (Infundibulum, Ampulla und Isthmus) [78]. In der Literatur wird eine Spanne der Schlagfrequenz von 5–20 Hz beschrieben, die auch mit den unterschiedlichen Messmethoden begründet werden kann [78], [79], [80].

Beim männlichen Organismus spielt der pH-Wert sowohl in den Ductuli efferentes als auch bei den Spermien eine wichtige Rolle. Ein niedriger intrazellulärer pH-Wert hemmt die Bewegung und den Metabolismus der Spermien [81], Bikarbonat dagegen aktiviert die Adenylatzyklase der Spermien und führt zu einer Erhöhung der Produktion von cAMP [82]. In den Nebenhoden, wo die Spermien gespeichert werden, herrscht ein pH-Wert von 7,11–7,26. Die Ductuli efferentes testis, die die noch unreifen Spermien zur Reifung vom Hoden in den Nebenhoden transportieren, weisen im Vergleich einen pH-Wert von 7,41–7,66 auf [83].

Die Ventrikel des Gehirns sind ebenfalls mit zilientragenden Zellen ausgekleidet, den Ependymzellen. Um die Zirkulation der cerebrospinalen Flüssigkeit zu gewährleisten sind neben der hydrostatischen Druckdifferenz zwischen Produktions- und Absorptionsstätte des Liquors, den Pulsationen der im Gehirn lokalisierten Arterien [84], noch die gerichteten Schläge der Zilien der Ependymzellen notwendig [85]. Beim Vergleich der zilientragenden Zellen des Zentralnervensystems mit denen des Respirationstrakts zeigen sich neben der niedrigeren Schlagfrequenz der Ependymzellen auch Unterschiede im Ablauf des Zilienschlags. In der Studie von Lechtreck werden die Schlagfrequenz der trachealen Zilien in Wildtyp-Mäusen mit 15,7 Hz und die der ependymalen mit 10,7 Hz angegeben [86]. Die unterschiedlichen Schlagfrequenzen lassen sich zum einen mit dem Aufbau der jeweiligen Zilien erklären, die ependymalen sind deutlich länger als die trachealen, zum anderen an den sich unterscheidenden Aufgaben, die trachealen transportieren mitunter hochviskösen Mukus, während die ependymalen cerebrospinale Flüssigkeit bewegen. Beim Schlagmuster der jeweiligen Zilien zeigt sich, dass die trachealen bei der Vorwärts- und Rückwärtsbewegung leichte Abweichungen zu beiden Seiten haben, die ependymalen hingegen bewegen sich bei dem Kraftschlag nach rechts und bei dem Erholungsschlag nach links [87]. Der physiologische pH-Wert des Liquors

bewegt sich im Bereich von 7,1–9. Die Schwankungen liegen in der Methode der Gewinnung der cerebrospinalen Flüssigkeit begründet [88].

1.2.8 Auswirkung verschiedener pH-Werte auf das respiratorische Epithel

Die Untersuchung der Schlagfrequenz der Zilien ist in der Vergangenheit schon häufig mit unterschiedlichen Methoden an Mensch und Tier erforscht worden. Im Jahre 1974 konnte gezeigt werden, dass die Zilien dazu im Stande sind stählerne Kugeln mit einem Durchmesser von 1 mm mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mm/s zu bewegen [89]. Ein Großteil der Studien jedoch, die sich mit den Auswirkungen verschiedener pH-Werte auf die Aktivität der Zilien beschäftigen, sind an wirbellosen Tieren und Protisten durchgeführt worden [90]. In diesen Organismen ist die Schlagfrequenz an den charakteristischen und stabilen pH-Wert der Umgebung angepasst. Das respiratorische Epithel allerdings ist aufgrund des Atemzyklus pH-Schwankungen ausgesetzt [91]. Beim Menschen zeigt sich eine pH-Spanne von 6,9–9,0 im trachealen Mukus [92]. Bei Infektionen können pH-Werte im Bereich von 5,8 erreicht werden [93]. Das respiratorische Epithel ist dazu im Stande solche Extreme auszuhalten und den Zilienschlag aufrechtzuerhalten. Die nasalen zilienträgenden Zellen sind pH-Variationen von 7,0 bis 9,0 ausgesetzt [94]. Die Pufferkapazität des Bronchialsekrets (bestehend aus periziliärer Flüssigkeit und Mukus) ist niedriger als die des Plasmas, variiert von Tag zu Tag sowie individuell. Die pH-Schwankungen können auch durch Exposition gegenüber sauren Komponenten entstehen [95]. Hyper- oder Hypokapnie bewirken Veränderungen der CO₂-Konzentration der periziliären Flüssigkeit, die zu pH-Veränderungen führen [96]. Lokale Perfusions-Ventilations-Störungen können diesen Zustand noch verstärken. Bei Betrachtung des Bronchialsystems und der Schlagfrequenz, der dortigen Zilien konnte gezeigt werden, dass die Frequenz in den peripheren Bronchiolen deutlich niedriger ist, als in den proximalen Bronchien (4,6 Hz versus 7,1 Hz) [97]. In weiterführenden Studien konnte an humanen Zellen demonstriert werden, dass es in den Bronchien zu keinen signifikanten Änderungen der Schlagfrequenz bei pH-Werten von 7,5–10,5 und in den Bronchiolen bei Werten von 5,5–10,5 kam. Eine erhebliche Reduktion der

Frequenz konnte in den Bronchen bei pH-Wert 7,0 und in den Bronchiolen bei pH-Wert 5,0 beobachtet werden. Bei Proben, die Extremwerten wie 3,0 oder 11,0 ausgesetzt wurden, wurde das Gewebe innerhalb weniger Minuten irreparabel geschädigt [98]. Bei all diesen Studien wurden der extrazelluläre pH-Wert des Milieus und seine Auswirkungen auf die ZSF untersucht. Bei spezieller Betrachtung und Veränderung des intrazellulären pH-Wertes zeigte sich, dass es ebenfalls zu einer Zunahme der Frequenz im alkalischen und zu einer Abnahme der Frequenz im aziden Bereich kam. Der genaue Mechanismus konnte dabei noch nicht eindeutig geklärt werden [99].

1.3 Ziele und Fragestellung dieser Arbeit

Der pH-Wert beeinflusst bei physiologischen und pathophysiologischen Zuständen unterschiedliche Funktionen der Atemwege. Dabei kommen sowohl alkalischen als auch aziden Schwankungen Bedeutungen zu, die auf das respiratorische Epithel Einfluss haben. Zum einen ist das Milieu, in dem sich die Zellen befinden, also der extrazelluläre pH-Wert, ein wichtiger Faktor. Zum anderen kommt dem intrazellulären pH-Wert und seinen Auswirkungen auf die ZSF, und damit auch der PTG, enorme Wichtigkeit zu. Aus diesem Grund sollen folgende Fragen in dieser Arbeit bearbeitet werden:

- Hat der extrazelluläre pH-Wert bei Änderungen in azide oder alkalische Bereiche einen Einfluss auf den von Zilienschlägen vermittelten Partikeltransport und die ZSF in der Trachea der Maus?
- Sind diese Effekte reversibel?
- Wie verändern sich PTG und ZSF bei Hemmung von epithelial-gelegenen Natrium-Kanälen (ENaC) und Anionen-Austauschern bei aziden pH-Werten?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Präparation der Trachea

An männlichen CL57/B6 Mäusen, die aus spezifiziert pathogenfreier Haltung stammten, wurden Tiertötungen durchgeführt. Die Versuche wurden anschließend am entnommenen vitalen Organ Trachea dieser Tiere ausgeführt. Eine inhalative Überdosis von Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) wurde zur Tötung der Tiere verwendet. Nach zweiminütiger Inhalation von 5–7 Volumen% Isofluran wurde nach Fixierung des Versuchstiers auf der Präparationsunterlage das Abdomen eröffnet und die abdominale Aorta durchtrennt. Im Anschluss erfolgte eine beidseitige laterale Thorakotomie mit Durchtrennung aller Rippen und der Schlüsselbeine. Nach Absetzen des ventralen Anteils des Brustkorbs wurde mit dem Eröffnen des Mediastinums fortgefahren. Es folgte die Darstellung der Trachea, welche im nächsten Schritt von umgebenden Blutgefäßen und umliegendem Bindegewebe freipräpariert wurde. Der dorsal an der Trachea anhaftende Ösophagus wurde im letzten Schritt vor dem Absetzen der Trachea unterhalb der Cartilago cricoidea und oberhalb der Bifurcatio tracheae sorgfältig entfernt. Die Entfernung aus dem Situs erfolgte durch quer verlaufende Durchtrennung der Trachea.

Die sich anschließende Feinpräparation wurde mit Federschere und Pinzette unter der Stereolupe (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Das Organ wurde hierfür in einer mit HEPES-Ringer-Lösung gefüllten Kulturschale mit Minutien fixiert. Dabei wurde die Trachea von überschüssigem, die Trachea umgebendem, Bindegewebe befreit. Danach wurde die Trachea im knorpelfreien dorsalen Teil der Länge nach am M. trachealis eröffnet. Die Trachea wurde mit der ventralen Seite nach unten und der eröffneten Seiten nach oben mit Minutien fixiert. Die für die Fixierung verwendete beheizbare Kulturschale (Bioprotech, Butler, PA, USA) war im Vorfeld mit Sylgard-Elastomer (Dow Corning, Midland, MI, USA) beschichtet worden. Gefüllt wurde die Schale mit HEPES-Ringer-Lösung (5,6 mM KCl, 136,4 mM NaCl, 11 mM Glucose, 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 1mM MgCl₂-6-hydrat, 2,2 mM CaCl₂-2-hydrat) mit pH-Wert 7,4 bei einer Temperatur von 30°C.

Die Entfernung von Geweberesten, Mukus, Haaren und Blut von der Trachea erfolgte durch mehrfaches Spülen mit HEPES-Ringer-Lösung.

2.2 Versuchsvorbereitung und Messung von Partikeltransportgeschwindigkeit und Zilienschlagfrequenz

2.2.1 Versuchsvorbereitung

Nach Abschluss der Präparation wurde die zum Spülen verwendete HEPES-Ringer-Lösung entfernt und durch 2 ml auf 37°C vorgewärmte, frisch zubereitete Lösung mit pH-Wert 7,4 ersetzt.

Die Kulturschale wurde in der dafür vorgesehen Halterung der Heizeinheit (Delta TC3, Bioptechs, USA) des Mikroskops (Olympus BX50 WI, Hamburg, Deutschland) eingespannt. Eine konstante Versuchstemperatur von 30°C wurde durch die integrierte Heizeinheit während der Versuche gewährleistet. Eine Temperaturkontrolle fand während des Versuchs unter Verwendung einer Messsonde statt.

Damit die Pufferlösung ausgetauscht werden konnte, wurde eine Zweikanal Micro-Perfusions-Pumpe (Chromaphor Analysen-Technik GmbH, Bottrop, Deutschland), verwendet. Diese Pumpe war auf der gleichen Höhe wie die Kulturschale positioniert. Mit ihren peristaltischen Bewegungen sorgte sie für einen gleichmäßigen, synchronen Zu- und Abfluss der Pufferlösungen. Der jeweilige Puffer wurde über Perfusorleitungen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) die zur Isolation mit PU-Bauschaum ummantelt waren, gepumpt. Die Pumpe benötigte 1:45 Minuten, um 2 ml Flüssigkeit zu- bzw. abzuführen. Anschlossen wurden die Leitungen an eigens dafür bearbeitete Kulturschalen, welche sich dadurch auszeichneten, dass sie zwei Einmalkanülen (Becton Dickinson Microlance 3, 19G, Heidelberg, Deutschland) durch gebohrte Öffnungen im Plastikrand besaßen. Eine Kanüle diente als zuführender Anschluss, über die andere wurde Flüssigkeit abgepumpt. Die jeweilige Pufferlösung wurde in einem Wasserbad erwärmt, welches eine Temperatur von 61°C hatte. Durch die „Low-Flow“-

Einstellung der Pumpe, die 75 ml Flüssigkeit pro Stunde förderte, kühlte die Pufferlösung beim Durchfließen der Leitungen wieder auf 30°C ab. Während jeden Versuchs wurden Temperaturkontrollen durchgeführt (Abb. 2.1).

Bei den verwendeten Pufferlösungen handelte es sich um Lösungen auf HEPES-Basis, denen im aziden pH-Bereich MES und im basischen CAPSO hinzugefügt wurde. Im aziden Bereich wurden Lösungen mit pH-Werten 5,0, 6,0, 7,0 verwendet. Die aziden Lösungen wurden mit MES/HCl auf die jeweiligen pH-Werte eingestellt. Die HEPES-Ringer-Lösung setzte sich dafür aus 5,6 mM KCl, 126,4 mM NaCl, 11 mM Glucose, 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), MgCl_2 -6-hydrat, 2,2 mM CaCl_2 -2-hydrat und 10 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_4\text{S}$ (MES) zusammen. Die basische Lösung wurde mit CAPSO/NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und bestand aus 5,6 mM KCl, 126,4 mM NaCl, 11 mM Glucose, 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), MgCl_2 -6-hydrat, 2,2 mM CaCl_2 -2-hydrat und $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{S}$ (CAPSO). Ein weiterer verwendeter Puffer setzte sich aus 5,6 mM KCl, 126,4 mM NaCl, 11 mM Glucose, 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), MgCl_2 -6-hydrat, 2,2 mM CaCl_2 -2-hydrat und 10 mM NH_4Cl zusammen. Abhängig vom jeweiligen Versuchsaufbau wurden der Pufferlösung noch 150 μM DiDs (Sigma-Aldrich, Steinheim) und/oder 100 μM Amilorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) beigelegt.

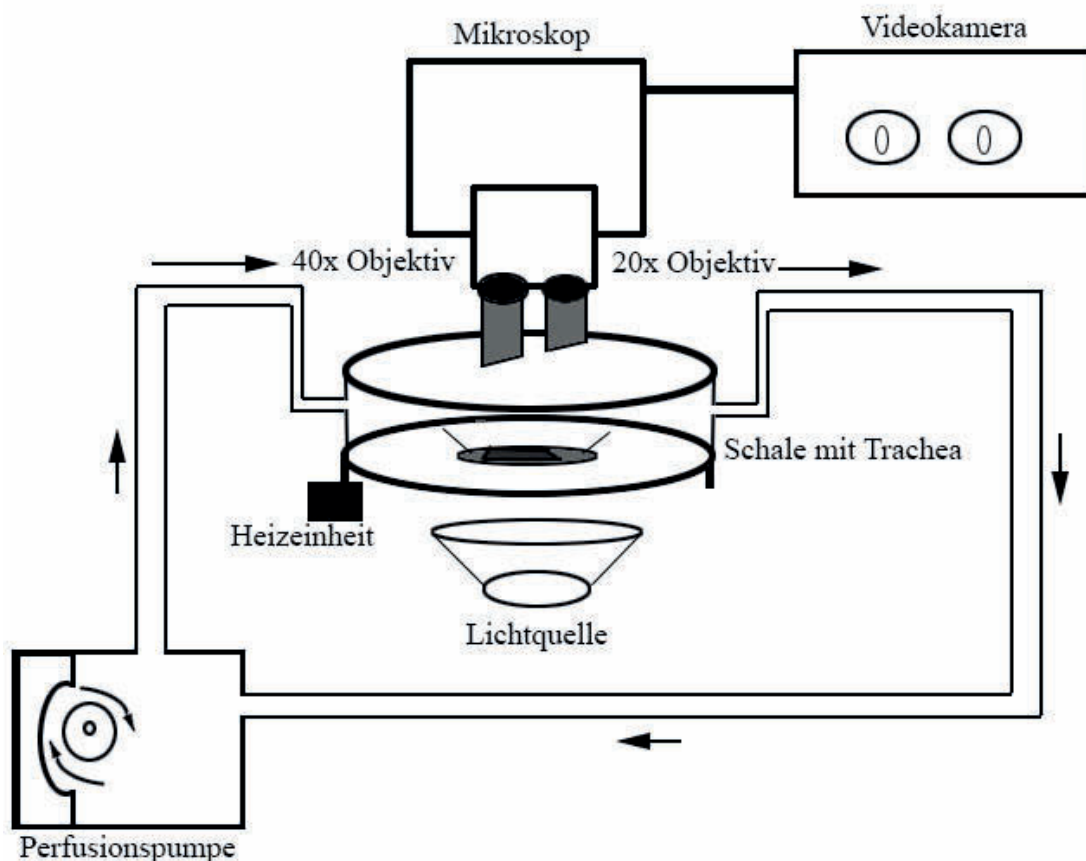


Abb. 2.1 Schema des Versuchsaufbaus für Partikeltransportgeschwindigkeit und Zilienschlagfrequenz. Über die Perfusions-Pumpe wird HEPES-Ringer-Lösung zu- bzw. abgeleitet. In der Kulturschale befindet sich die zu untersuchende Trachea. Die Videosequenzen werden dabei durch Eintauchen der entsprechenden Objektive in 40facher Vergrößerung (ZSF) oder 20facher Vergrößerung (PTG mit Dynabeads) aufgenommen. Durch die Heizeinheit wird konstant eine Versuchstemperatur von 30°C eingestellt.

2.2.2 Durchführung und Aufnahme des Partikeltransportes

In die präparierte Trachea und die 2 ml HEPES-Ringer-Lösung enthaltende Kulturschale wurden 2 μ l einer Suspension von Polystyren-Partikeln (Dynabeads, Dynal, Biotech, Hamburg, Deutschland) mit einem Durchmesser von 2,8 μ m gegeben. Beobachtet wurde der Partikeltransport unter Durchlichtmikroskopie mit einem 20x Eintauchobjektiv (Olympus UM Plan FL 20x/0,5W). Die Messungen wurden an einer Region zwischen zwei Knorpelspannen durchgeführt, die nach

Möglichkeit keine größeren Blutgefäße beinhaltet. Die eingestellte Region wurde während der gesamten Versuchsdauer nicht verändert. Um den zilienvermittelten Transport der Dynabeads möglichst gut beobachten zu können wurde die Fokusebene knapp oberhalb der Zilienspitzen eingestellt. Die Filmsequenzen, die für die Geschwindigkeitsmessung des Partikeltransportes benötigt wurden, wurden mit einer Schwarz/Weiß Digitalkamera (Imago, TILL Photonics, Gräfeling, Deutschland) erstellt. Dabei betrug die Auflösung des CCD Chip 1280x960 Pixel. Die einzelnen Pixel wurden mit einer Genauigkeit von 12 Bit aufgenommen.

Die verwendete Digitalkamera wurde zum einen mit dem Computerprogramm Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA) und zum anderen mit der Hardware-Kontrolleinheit Polychrome II (TILL Photonics, Gräfeling, Deutschland) gesteuert. Pro Bild wurde eine Belichtungszeit von 20 ms eingestellt und ein Binning (Zusammenfassen benachbarter Pixel) von 2x2 Pixel verwendet. Die Aufnahmefrequenz entsprach 11,78 Bildern pro Sekunde, bei 200 aufgenommenen Bildern pro Messzeitpunkt.

2.2.3 Auswertung des Partikeltransportes

Die einzelnen Filmsequenzen wurden mit dem Programm Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA) bearbeitet. Damit konnte die PTG entlang des Trachealepithels berechnet werden. Die Auswertungsschritte für einen einzelnen Zeitpunkt stellen sich wie folgt dar. Die Bildsequenz wurde zunächst kopiert und in Kopie von 12 Bit Grauwerte auf 8 Bit Grauwerte umgerechnet. Ein Durchschnittsbild wurde von den Bildern der Originalsequenz errechnet. Das entstandene Durchschnittsbild wurde von allen Sequenzbildern Pixel für Pixel subtrahiert. Kam es bei der Subtraktion eines Pixels zu einem negativen Wert, so wurde der Betrag des Ergebnisses verwendet. Daraus resultierte eine Bildsequenz, welche die sich bewegenden Dynabeads hell, den Hintergrund dunkel abbildete. Zur Kalibrierung und der korrekten räumlichen Erfassung der abgebildeten Partikel wurde die entsprechende vorgegebene Maske gewählt. Mit dem Sequenzregler wurde das typische Bild für den Schwellwert der Partikelerkennung eingestellt und in ein Binärbild konvertiert. Danach wurden die Tracking Optionen für die

Partikelerkennung geladen, um die Bewegungsbahnen der Partikel darstellen zu können. Diese waren nach dem letzten Schritt, in dem die Schwellwerte zur korrekten Darstellung im Histogramm bearbeitet wurden, sichtbar.

Für den Tracking-Algorithmus wurden spezifische Parameter festgelegt. Die maximale Pixeldistanz, die von einem Partikel im Vergleich zum vorhergehenden Bild zurückgelegt werden durfte, wurde mit 20 Pixel/frame² festgelegt. Dynabeads mussten in mindestens 10 aufeinanderfolgenden Bildern sichtbar sein, um in die Berechnung aufgenommen zu werden. Solche, die nur eine sehr kurze Wegstrecke in der Fokusebene lagen, wurden aussortiert. Ein Mittelwert wurde aus den einzelnen Geschwindigkeitsmessungen errechnet. Zur Errechnung der Geschwindigkeit der Dynabeads in $\mu\text{m/s}$ muss ein Korrekturfaktor verwendet werden, welcher für jedes Objektiv kalkuliert ist. Der Grund dafür ist, dass die Partikeltransportgeschwindigkeit von der verwendeten Software in einer für das Programm spezifischen Einheit angegeben wird. Der Faktor für den Versuchsaufbau mit dem 20er Objektiv beträgt 0,0073885 (Abb. 2.2).

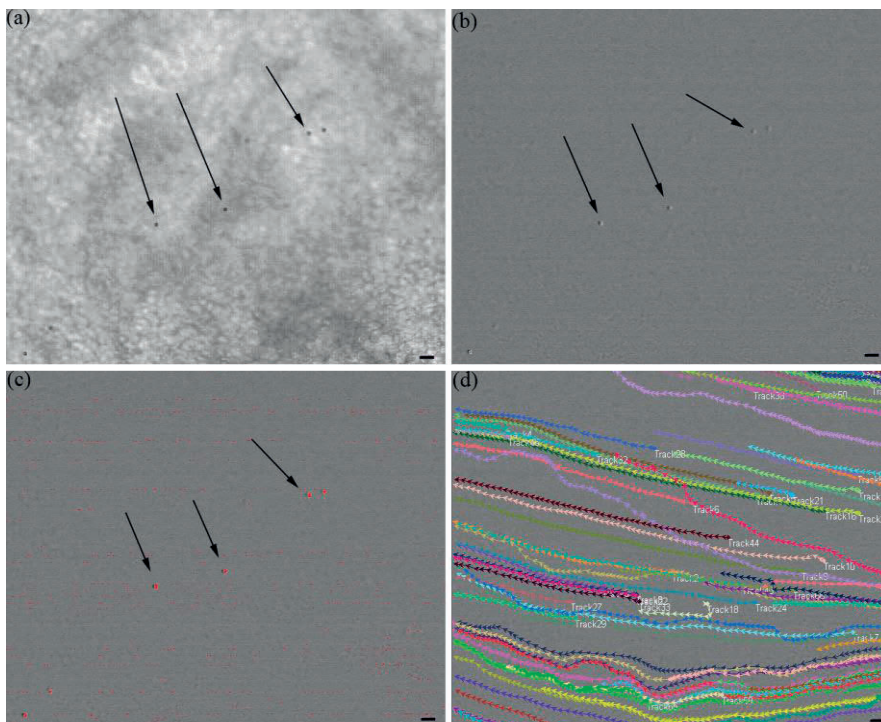


Abb. 2.2 *Ablauf der Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit* (a) Durchlichtaufnahme bei Vergrößerung 1:20 in Graustufen mit Dynabead-Partikeln (Pfeile) (b) automatisch errechnetes Differenzbild, welches durch den Abzug des zuvor erstellten Durchschnittsbildes von allen Bildern einer Filmsequenz entsteht (c) Kalibrierung des entstandenen Bildes (d) Darstellung der Wege der Dynabead-Partikel, Maßstabsbalken = 100 μm

2.2.4 Durchführung und Aufnahme der Zilienschlagfrequenz

In die Kulturschale, die die entsprechend präparierte Trachea enthielt, wurden 2 ml HEPES-Ringer-Lösung gefüllt. Auswahlkriterium für den aufzunehmenden Bildausschnitt war das Vorhandensein möglichst vieler, gleichmäßig verteilter zilientragender Zellen. Die ausgewählte Region wurde während der gesamten Versuchsdauer beibehalten. Angefertigt wurden die ZSF darstellenden Aufnahmen unter Durchlichtmikroskopie mit einem 40x Eintauchobjektiv (Olympus UM Plan FL 40x/0,5W). Das Darstellungsfeld betrug 640 x 480 Bildpunkte, bei einer Auflösung des Chips von 1280 x 786. Bei diesem Versuchsaufbau wurden zu definierten Zeitpunkten 1000 Bilder pro Film angefertigt. Die Filme, die für die Frequenzmessung des Zilienschlags benötigt wurden, wurden mit einer Schwarz/Weiß Digitalkamera (Imago, TILL Photonics, Gräfeling, Deutschland) erstellt. Durch die eingestellte Belichtungszeit von 7,71 ms und einer Zeit von 9,52 ms zwischen den Fotos ergab sich eine Frequenz, die 105 Bildern pro Sekunde entsprach. Zur Steuerung der Digitalkamera wurden das Computerprogramm Image Pro Plus sowie die Hardware-Kontrolleinheit Polychrome II (Polychrome II, TILL Photonics, Gräfeling, Deutschland) verwendet.

2.2.5 Auswertung der Zilienschlagfrequenz

Die Auswertung und Berechnung der ZSF wurde unter Zuhilfenahme der Programme Image Pro Plus und Autosignal (Systat Software, San José, USA) durchgeführt. Zu Beginn erfolgten Durchlichtaufnahmen der Trachealepitheloberfläche mit den zilientragenden Zellen. Nach Laden des Films wurden auf dem Startbild pro Versuch acht willkürlich ausgewählte zilientragende Zellen markiert, eine sogenannte „region of interest“. Aus diesem Bereich wurden für die 1000 Bilder einer Filmsequenz die Mittelgrauwerte errechnet. Das Resultat war eine Kurve, welche mit einer Fast Fourier Transformation, die in die Software implementiert war, umgerechnet wurde. Die aus dieser Rechenoperation resultierende dominante Frequenz wurde zum jeweiligen Messpunkt als ZSF der Zelle angesehen. Die Frequenz der markierten acht „regions of interest“ wurde für

jeden Messzeitpunkt gemittelt. Aus den Ergebnissen wurde ein Diagramm erstellt (Abb. 2.3).

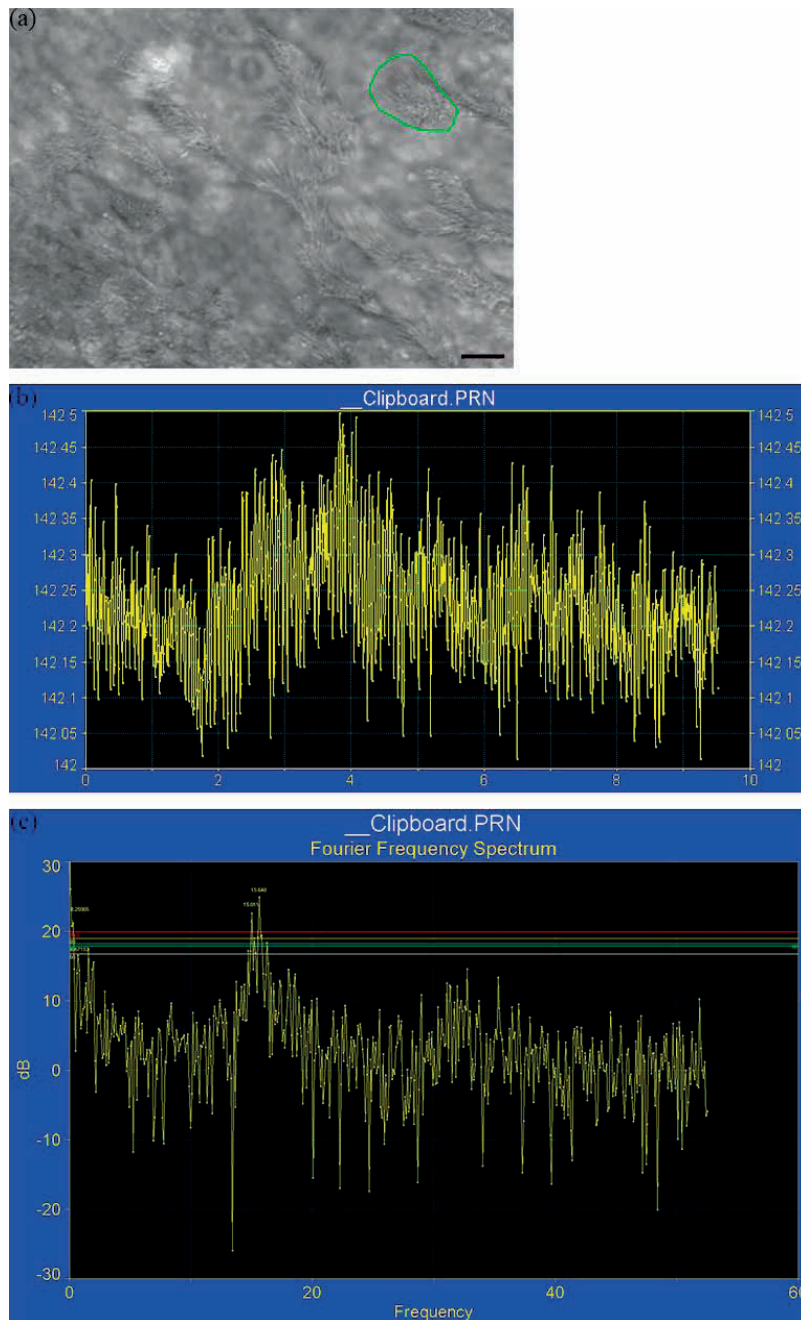


Abb. 2.3 *Ablauf der Messung der Zilienschlagfrequenz* (a) Einzelbild mit zilientragenden Zellen, in dem eine sogenannte „region of interest“ umgrenzt wurde. Innerhalb dieser Region findet für jedes Bild einer Sequenz die Berechnung des Mittelgrauwertes statt (Vergrößerung 1:40). (b) Dargestellt sind die Mittelgrauwerte für jedes der 1000 Bilder eines Filmes (grün markierte region of interest). Die daraus resultierende Kurve wurde unter Verwendung einer Fast Fourier Transformation umgerechnet. (c) Durch die Fast Fourier Transformation wurde die errechnete richtungsweisende Frequenz zum jeweiligen Messpunkt als Zilienschlagfrequenz für diese Zelle betrachtet. Maßstabsbalken = 100 μm

2.3 Versuche

2.3.1 Versuchsbeginn

Jeder Versuchsaufbau verlief nach einem einheitlichen Zeitplan, der sich aus einer Ruhe- und einer Stimulationsphase zusammensetzte. Am Ende eines jeden Versuchs wurde eine Vitalitätsprüfung des Gewebes durch die Zugabe von 100 μ M ATP (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) durchgeführt. Bei allen Versuchen wurde mit der Aufzeichnung von sieben Filmsequenzen 30 Minuten nach der Organentnahme begonnen (T30, T35, T40, T45, T50, T55, T60), wobei Tx den jeweiligen Zeitpunkt der Messung angibt. Jeder Versuch hatte seinen Anfangszeitpunkt bei T30. Die darauf folgenden sechs Filme wurden im Abstand von jeweils 5 Minuten aufgenommen. Damit wurde eine Dokumentation der Ausgangssituation ohne Beeinflussung durch chemische oder mechanische Reize sichergestellt. Beim Wechsel der Pufferlösungen wurde in Vorversuchen ermittelt, dass nach dreimaligem zweiminütigem Laufen der Micro-Perfusions-Pumpe die vorherige Pufferlösung komplett durch die neue Pufferlösung ausgetauscht wurde. Die Pumpe wurde beim Pufferwechsel jeweils direkt nach Beendigung der vorhergehenden Filmaufnahmen angeschaltet, gleiches galt für die Zugabe und Verwirbelung von bereits gelösten Substanzen in die jeweilige Pufferlösung, welche mittels einer Pipette durchgeführt wurden. Die Flüssigkeitsmengen der zugeführten Substanzen lagen zwischen 1,5 und 3 μ l. Unter ständigen Zwischenkontrollen der Temperatur in der Messkammer wurde sichergestellt, dass diese konstant bei 30°C lag.

2.3.2 Kalibrierung der Micro-Perfusions-Pumpe

Die Vorversuche dienten der Ermittlung der Zeit, die benötigt wurde 2 ml Pufferlösung komplett auszutauschen. Dafür wurde zum einen die Zeit gemessen, die die Pumpe benötigte 2 ml einer Flüssigkeit über die isolierte Perfusorleitung in eine bearbeitete Kulturschale zu befördern. Innerhalb von 1:45 Minuten war die Kulturschale gefüllt. Zum anderen wurde ermittelt, ab wann davon ausgegangen

werden konnte, dass die ursprüngliche Pufferlösung komplett durch eine neue ersetzt wurde. Zu Beginn dieser Versuche wurden 2 ml HEPES-Ringer-Lösung (pH 7,4) in eine modifizierte Kulturschale mit zwei Einmalkanülen im Rand gefüllt. Die HEPES-Ringer-Lösung (pH 7,4) wurde bei den Vorversuchen durch MES-Ringer-Lösung (pH 6,0) und in weiteren Versuchen durch CAPSO-Ringer-Lösung (pH 8,0) ausgetauscht. Nach jedem Lauf der Pumpe wurde der pH-Wert in der Kulturschale mithilfe von pH-Teststreifen bestimmt. Auch wenn die Teststreifen eine gewisse Ungenauigkeit aufweisen, so war der Einsatz einer pH-Wertmesssonde aufgrund der geringen Volumina nicht durchführbar. Am Ende des ersten Laufs war bereits eine Veränderung des pH-Wertes abzulesen. Ein nahezu kompletter Umschlag wurde aber erst ab dem zweiten Lauf sichtbar. Um zu gewährleisten, dass der pH-Wert aber sicher umgeschlagen war und somit der Puffer komplett ausgetauscht war, wurde ein dritter Lauf durchgeführt (Abb. 2.4). Die Temperatur wurde unter ständiger Zwischenkontrolle auf 30°C gehalten. Die Messung des pH-Wertes wurde hierbei mit pH-Teststreifen durchgeführt, da hierbei der Wert über Säure-Base-Indikatoren bestimmt wird und nicht auf elektrochemischem Wege wie bei der pH-Metrie.

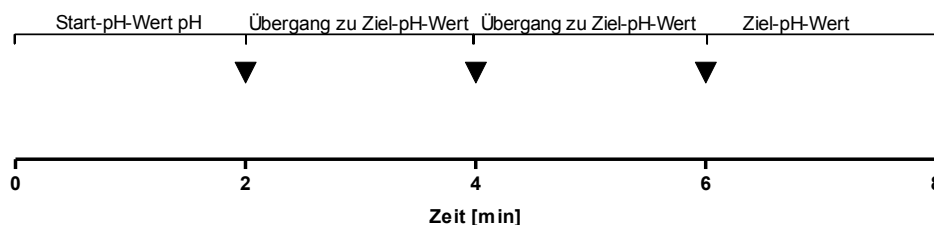


Abb. 2.4 Vorversuche zur Ermittlung, ab welchem Zeitpunkt die vorherige Pufferlösung komplett durch die neue Pufferlösung ausgetauscht wurde. Dabei lief die Micro-Perfusions-Pumpe jeweils für 2 Minuten. Die Lösung mit dem Start-pH-Wert von 7,4 wurde dabei innerhalb von 3 Pumpvorgängen durch azide bzw. basische Lösungen ausgetauscht. Nach jedem Lauf der Pumpe wurde der pH-Wert kontrolliert. ▼ - Aktivität der Pumpe für 2 Minuten

2.3.3 Auswirkungen des Pumpvorgangs und veränderter pH-Werte auf den Partikeltransport und die Zilienschlagfrequenz

In diesen Versuchen wurde der Einfluss der Micro-Perfusions-Pumpe auf die PTG und die ZSF untersucht. Es sollte ermittelt werden, ob es zu Veränderungen der Zilientätigkeit in Abhängigkeit der Flüssigkeitsströmung durch das Zu- und Ableiten von Flüssigkeit kommt. Die verwendeten Pufferlösungen waren zum Versuchsbeginn HEPES-Ringer-Lösung (pH 7,4), welche mit frisch zugeleiteter HEPES-Ringer-Lösung (pH 7,4) ersetzt wurde. Nach Abschluss der Messungen während der Ruhephase (T30, T35, T40, T45, T50, T55, T60) wurden die Messintervalle von fünf auf drei Minuten reduziert (T63, T66, T69, T72, T75, T78, T81, T84, T87, T90). Tx beschreibt dabei die Zeitpunkte der Messungen. Nach dem Erstellen der Filmsequenz zum Zeitpunkt T60 wurde die Pumpe angeschlossen. Der Pumpvorgang dauerte 2 Minuten, gefolgt von 1 Minute Erholungsphase. Dieser Vorgang wurde zu den Zeitpunkten T63 und T66 wiederholt. Da bei den Pufferwechseln neben dem jeweiligen Puffer auch Dynabead-Partikel abgepumpt wurden, wurde bei den Versuchen zur PTG nach den jeweiligen drei Durchläufen der Pumpe nach dem Messpunkt T69 1 µl Dynabeads hinzu pipettiert. Ab Zeitpunkt T90 wurden die Messintervalle auf 2 Minuten reduziert (T92, T94, T96, T98, T100). Des Weiteren folgte nach Erstellen der Filmsequenz bei T90 die Zugabe von 100 µM ATP. Die Versuchsgruppe bestand bei der PTG aus 6 Tieren und bei der ZSF aus 5. Des Weiteren wurde der Einfluss von MES-Ringer-Lösung mit pH 5,0 und CAPSO-Ringer-Lösung mit pH 8,0 auf die ZSF untersucht. Nach der anfänglichen Ruhephase erfolgte ab den Messzeitpunkten T60, T63 und T66 die Umstellung des pH-Wertes 7,4 auf pH 5,0 bzw. pH 8,0. Die Vitalitätskontrolle wurde bei Messzeitpunkt T90 mit 100µM ATP durchgeführt. Für diesen Versuchsaufbau wurden jeweils 5 Versuchstiere verwendet. Ebenso wurde der Einfluss von MES-Ringer-Lösung mit pH 6,0 und CAPSO-Ringer-Lösung mit pH 8,0 auf die PTG analysiert. Nach der anfänglichen Ruhephase erfolgte ab den Messzeitpunkten T60, T63 und T66 die Umstellung von pH 7,4 auf pH 6,0 bzw. pH 8,0. Nach dem Erreichen des T69-Messpunktes wurden 1 µl Dynabead-Partikel hinzugegeben. Die Vitalitätskontrolle

wurde bei Messzeitpunkt T90 mit 100 μ M ATP durchgeführt. Die Gruppengröße für diese Versuche betrug jeweils 6 Tiere (Abb. 2.5).

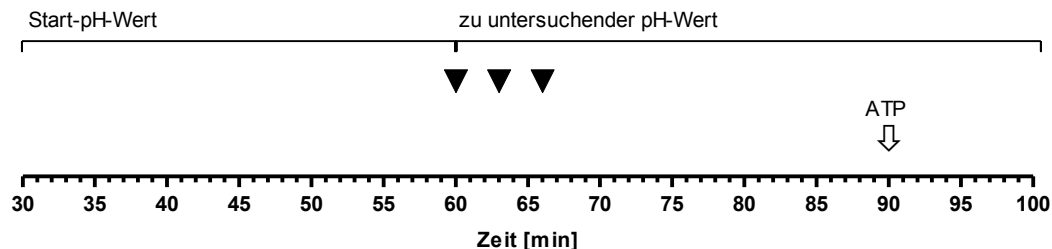


Abb. 2.5 *Aufbau der Versuche mit einfachem Pufferwechsel.* Sowohl bei der Untersuchung der PTG, als auch der ZSF wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 ein Wechsel der Pufferlösung über die Pumpe durchgeführt. ▼ - Aktivität der Pumpe für 2 Minuten, ATP-Stimulation T90

2.3.4 Einfluss des Pufferwechsels auf pH-Werte im Bereich von 5,0–8,0 und Wiedereinstellung des physiologischen Start-pH-Wertes auf die Partikeltransportgeschwindigkeit

Mit diesem Versuchsaufbau wurden einerseits die Auswirkungen von unterschiedlichen pH-Werten auf die PTG untersucht, andererseits wurde mit dem zweiten Wechsel auf pH-Wert 7,4 untersucht, ob die beobachteten Effekte reversibel waren. Nach der Ruhephase erfolgte nach dem Messzeitpunkt T60 in den jeweiligen Versuchen der pumpengesteuerte Wechsel von HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 auf MES-Ringer-Lösungen mit den pH-Werten 5,0, 6,0 und 7,0, sowie CAPSO-Ringer-Lösung mit pH-Wert 8,0 mit zwei weiteren Durchläufen der Pumpe nach den Zeitpunkten T63 und T66. Nach dem T69-Marker wurden 1 μ l Dynabead-Partikel hinzugegeben. Jeweils nach den Messzeitpunkten T75, T78 und T81 wurden pumpengesteuert die Pufferlösung mit pH 5,0, 6,0 und 7,0, sowie der Puffer mit pH 8,0 gegen Pufferlösung pH 7,4 ausgetauscht. Nach dem T84-Marker wurden 1 μ l Dynabead-Partikel hinzugegeben. Nach dem Erreichen von Messzeitpunkt T90 wurden 100 μ M ATP zur Vitalitätskontrolle hinzugegeben. Die Größe der

Versuchsgruppe für diese Versuche betrug bei den Pufferlösungen mit pH 5,0 5 Tiere, bei pH 6,0 und 7,0 jeweils 6 Tiere. Die Gruppengröße der Versuche, die mit der Pufferlösung mit pH 8,0 behandelt wurden, betrug 6 Tiere (Abb. 2.6).

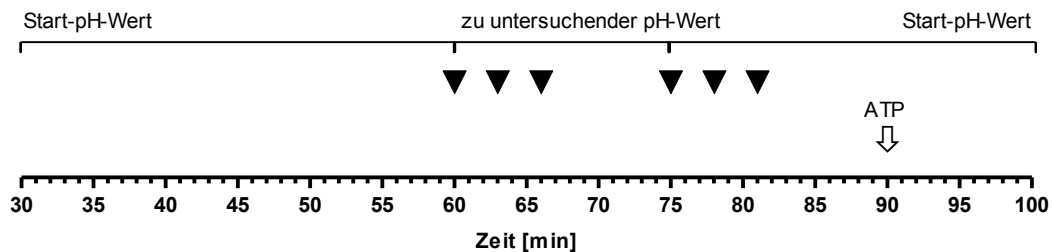


Abb. 2.6 *Aufbau der Versuche mit zweimaligem Pufferwechsel.* Sowohl bei der Untersuchung der PTG als auch der ZSF wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66, sowie T75, T78 und T81 ein Wechsel der Pufferlösung über die Pumpe durchgeführt. ▼ - Aktivität der Pumpe für 2 Minuten, ATP-Stimulation T90

2.3.5 Die Inhibitoren Amilorid und DiDs

Amilorid wirkt, indem es epithelial-gelegene Natrium-Kanäle (ENaC) direkt blockiert und somit die Aufnahmen von Natrium im distalen Tubulus, den Verbindungstubuli und Sammelrohren in der Niere, beeinflusst [100]. Dadurch verliert der Organismus Natrium und Wasser, ohne jedoch Kalium zu verlieren. Als Medikament wird es oft in Verbindung mit Thiaziden oder Schleifendiuretika zur Therapie arterieller Hypertonie verabreicht. Aufgrund seiner kaliumsparenden Wirkung kann es zu Hyperkaliämien kommen [101]. Amilorid erhöht zudem das Azidoserisiko [102]. Amilorid wirkt außerdem inhibierend auf die ENaC der Atemwege [103]. Des Weiteren hat Amilorid als Inhibitor von NHE-1 noch eine Wirkung am Herzen und minimiert Reperfusionsschäden bei ischämischen Infarkten [104].

4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic Acid (DiDs) ist ein Anionen-Austauscher-Inhibitor [105] und blockiert reversibel, und später irreversibel, Kanäle wie beispielsweise den Chlorid-Bikarbonat-Austauscher [106].

2.3.6 Einfluss von Amiloridzugabe auf die Partikeltransportgeschwindigkeit bei pH-Wert 5,0 und 7,4

In diesem Versuchsansatz wurde untersucht, ob die Zugabe von Amilorid (100 μ M) Auswirkungen auf die PTG hat. Nachdem die Ausgangsmessungen abgeschlossen waren, wurde pumpengesteuert die Pufferlösung pH 7,4 durch pH 5,0 ersetzt. Die Pumpe arbeitete jeweils nach den Messzeitpunkten T60, T63 und T66. Nach Erreichen der T69-Marke wurden 1 μ l Dynabead-Partikel, sowie 100 μ M Amilorid hinzugegeben. Nach den Messzeitpunkten T75, T78 und T81 wurden pumpengesteuert die Pufferlösung mit pH 5,0 durch pH 7,4 mit 100 μ M Amilorid im Puffer ausgetauscht. Eine Zugabe von 1 μ l Dynabeads erfolgte zum Zeitpunkt T84. Während der eine Versuchsaufbau nach der Vitalitätskontrolle mit 100 μ M ATP bei T90 nach 100 Minuten endete (Abb. 2.6), wurde in einem anderen Versuchsaufbau die Pufferlösung mit pH 7,4 mit 100 μ M Amilorid wieder pumpengesteuert ausgewaschen. Die Zeitintervalle wurden hierbei entsprechend geändert (T90, T93, T96, T99, T102, T105, T107, T109, T111, T113, T115), so dass es zu einem Pufferwechsel nach den Messzeitpunkten T90, T93 und T96 kam. 1 μ l Dynabeads wurden nach dem Zeitpunkt T99 hinzugefügt. In die wiedereingestellte HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 wurden bei einer gesamten Versuchsdauer von 115 Minuten bei Erreichen der T105-Marke 100 μ M ATP zur Vitalitätskontrolle hinzugegeben. Für den Versuchsaufbau, der mit der HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 mit 100 μ M Amilorid im Puffer in der Kulturschale endete, wurden 5 Versuchstiere benötigt. Die Gruppengröße des Versuchsdesigns mit erneutem Auswaschen des Amilorids durch HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 betrug 6 (Abb. 2.7)

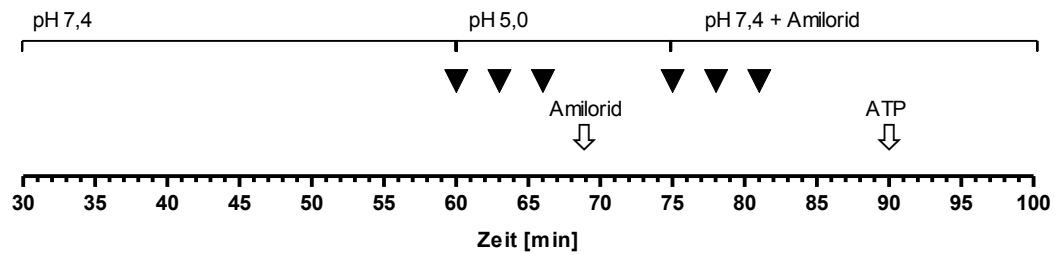


Abb. 2.6 Auswirkungen des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Wert 5,0 mit 100 μ M Amilorid und dem erneuten Wechsel auf pH-Wert 7,4 mit 100 μ M Amilorid. Aufbau der Versuche mit zweimaligem Pufferwechsel. Bei der Untersuchung der PTG wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66, sowie T75, T78 und T81 ein Wechsel der Pufferlösung über die Pumpe durchgeführt. ▼ - Aktivität der Pumpe für 2 Minuten, Amiloridgabe T69, ATP-Stimulation T90

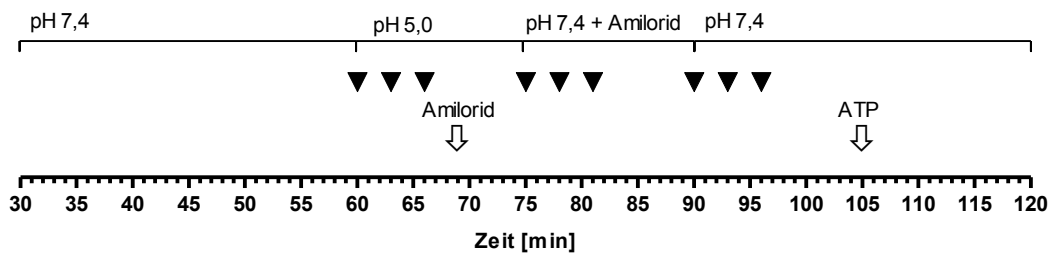


Abb. 2.7 Wirkungen des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Wert 5,0 mit 100 μ M Amilorid und dem erneuten Wechsel auf pH-Wert 7,4 mit 100 μ M Amilorid, gefolgt von Pufferwechsel auf pH 7,4. Aufbau der Versuche mit dreimaligem Pufferwechsel. Bei der Untersuchung der PTG wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66, sowie T75, T78 und T81, als auch T90, T93 und T96 ein Wechsel der Pufferlösung über die Pumpe durchgeführt. ▼ - Aktivität der Pumpe für 2 Minuten, Amiloridgabe T69, ATP-Stimulation T90

2.3.7 Auswirkungen der Ionenaustauscherinhibition durch DiDs und Amilorid auf die Zilienschlagfrequenz

Zu Beginn wurde getestet, welche Auswirkungen die Anwesenheit von 150 μM DiDs, sowie von 150 μM DiDs und 100 μM Amilorid in Kombination auf die ZSF hatten. Die Inhibition wurde dabei mit den Pharmaka Amilorid, welches epithelialgelegene Natrium-Kanäle (ENaC) direkt blockiert, und DiDs, das als Anionen-Austauscher-Inhibitor fungiert und Kanäle wie beispielsweise den Chlorid-Bikarbonat-Austauscher hemmt, durchgeführt. Die jeweiligen Substanzen waren bereits zu Beginn der Versuche in Standard-HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 gegeben worden. Die Vitalitätskontrolle wurde bei beiden Versuchsaufbauten ebenfalls bei Messzeitpunkt T90 mit 100 μM ATP durchgeführt. Die Versuchsgruppe umfasste jeweils 4 Tiere. Mit diesem Versuchsaufbau wurde untersucht, welche Auswirkungen die Anwesenheit von 150 μM DiDs, oder in Kombination mit 100 μM Amilorid auf die ZSF bei Anwesenheit von NH_4Cl hatten. 150 μM DiDs, oder in Kombination mit 100 μM Amilorid waren bereits zu Beginn der Versuche in HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 gegeben worden. Pumpengesteuert wurde zu den Messzeitpunkten T60, T63 und T66 das HEPES-Ringer-Puffer pH 7,4 durch HEPES-Ringer-Puffer pH 7,4 mit Zusatz von NH_4Cl mit 150 μM DiDs bzw. 150 μM DiDs und 100 μM Amilorid in Kombination ausgetauscht. Zu den darauffolgenden Messzeitpunkten T69, T72, T75 wurde die HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 zugeführt. Die Vitalitätskontrolle wurde jeweils bei Messzeitpunkt T90 mit 100 μM ATP durchgeführt. Die Gruppengröße für die jeweiligen Versuche betrug 4 (Abb. 2.8 und Abb. 2.9).

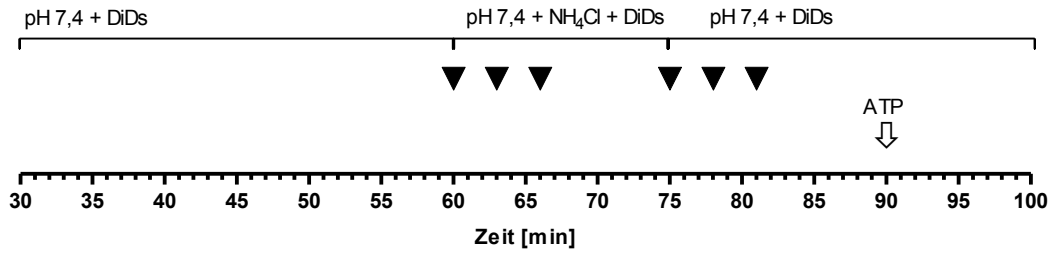


Abb. 2.8 Wirkungen von 150 μ M DiDs auf die Zilienschlagfrequenz bei Anwesenheit von NH_4Cl . Aufbau der Versuche mit zweimaligem Pufferwechsel. Bei der Untersuchung der ZSF wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66, sowie T75, T78 und T81 ein Wechsel der Pufferlösung über die Pumpe durchgeführt. ▼ - Aktivität der Pumpe für 2 Minuten, ATP-Stimulation T90

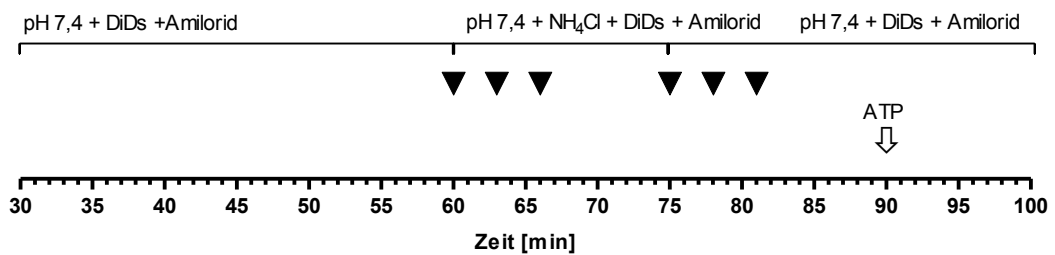


Abb. 2.9 Wirkungen von 150 μ M DiDs und 100 μ M Amilorid auf die Zilienschlagfrequenz bei Anwesenheit von NH_4Cl . Bei der Untersuchung der ZSF wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66, sowie T75, T78 und T81 ein Wechsel der Pufferlösung über die Pumpe durchgeführt. ▼ - Aktivität der Pumpe für 2 Minuten, ATP-Stimulation T90

2.4 Auswertung und Statistik

Um die PTG aus den jeweiligen Filmsequenzen errechnen zu können, wurde ein Tracking-Algorithmus verwendet. Mit dessen Hilfe wurde für jeden erfassten Dynabead-Partikel die durchschnittliche Geschwindigkeit errechnet und im Anschluss der Mittelwert aller Durchschnittsgeschwindigkeiten als PTG berechnet. Die PTG wurden innerhalb eines Versuchs jeweils vor und nach Veränderung des pH-Wertes bzw. vor und nach dem Hinzugeben einer zu untersuchenden Substanz miteinander verglichen. Bei den Versuchen zur Untersuchung der ZSF wurden für jede Filmsequenz mit Hilfe der Fast Fourier Transformation die Mittelgrauwerte von 8 zilentragenden Zellen gemittelt und jeweils in eine dominante Frequenz umgewandelt. Innerhalb eines Versuchs wurde jeweils die ZSF vor und nach Veränderung des pH-Wertes bzw. vor und nach der Zugabe einer zu untersuchenden Substanz miteinander verglichen. Die deskriptive Darstellung der untersuchten Parameter erfolgt durch den arithmetischen Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwertes. Die Daten wurden mit Normal Q-Q Plots und dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Die Überprüfung ergab in der Regel einen Widerspruch zur Hypothese der Normalverteilungsannahme. Somit wurden für die statistische Analyse ausschließlich nichtparametrische Verfahren verwendet. Sowohl bei der PTG als auch bei der ZSF erfolgte die statistische Auswertung durch Anwendung des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests über identische Zeitpunkte in mehreren Versuchen. Aufgrund der vielfach durchgeführten paarweisen Vergleiche zwischen identischen Zeitpunkten wurde das Signifikanzniveau in Abhängigkeit der Anzahl der Messzeitpunkte nach der Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert. Das multiple Signifikanzniveau nach Korrektur liegt bei $p=0,05$. Der gewählte Zeitpunkt war hierbei T75 bzw. T105. Für die Auswertung wurde das Statistikprogramm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., USA) verwendet. Um den Zusammenhang zwischen ZSF und PTG zu untersuchen, wurde der nichtparametrische Korrelationskoeffizient nach Spearman verwendet. Die Werte des Korrelationskoeffizienten wurden dabei von 0 bis 0,2 als sehr schwache, bis 0,5 als schwache, bis 0,7 als mittlere, bis 0,9 als starke und über 0,9 als sehr starke Korrelation eingestuft. Um den Effekt auf die Beschleunigung, der Änderung der PTG pro Minute, durch Amilorid zu untersuchen wurden zu definierten Zeitpunkten die Steigungen der Graphen miteinander verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte des Austauschs der Pufferlösung auf den Partikeltransport und die Zilienschlagfrequenz

Sowohl PTG als auch ZSF wurden unter Einfluss der Micro-Perfusions-Pumpe gemessen. Im Vergleich zu den Kontrollen, in denen kein Pufferwechsel im gleichen Zeitraum erfolgte, konnten bei der Bestimmung der PTG und der ZSF in HEPES-Ringer-Lösung mit pH-Wert 7,4 keine signifikanten Änderungen festgestellt werden. Die PTG beim pumpengesteuerten Pufferwechsel veränderte sich gleichmäßig von 50,97 \pm 5,35 $\mu\text{m/s}$ (T60) auf 43,89 \pm 6,15 $\mu\text{m/s}$ (T75) und im Verlauf auf 46,50 \pm 5,23 $\mu\text{m/s}$ (T90). Die Vitalitätskontrolle mit 100 μM ATP sorgte für eine Steigerung der Geschwindigkeit auf 105,5 \pm 3,05 $\mu\text{m/s}$ (T100). Bei vergleichender Betrachtung der Kontrolle zeigte sich ein ähnlicher Verlauf von 58,79 \pm 4,28 $\mu\text{m/s}$ (T60) zu 50,12 \pm 2 $\mu\text{m/s}$ (T75) über 43,51 \pm 2,65 $\mu\text{m/s}$ (T90). Nach Zugabe von 100 μM ATP stieg die Geschwindigkeit auf 125 \pm 6,9 $\mu\text{m/s}$ (T100) an ($p > 0,05$, T75) ($n=4$, Abb. 3.1).

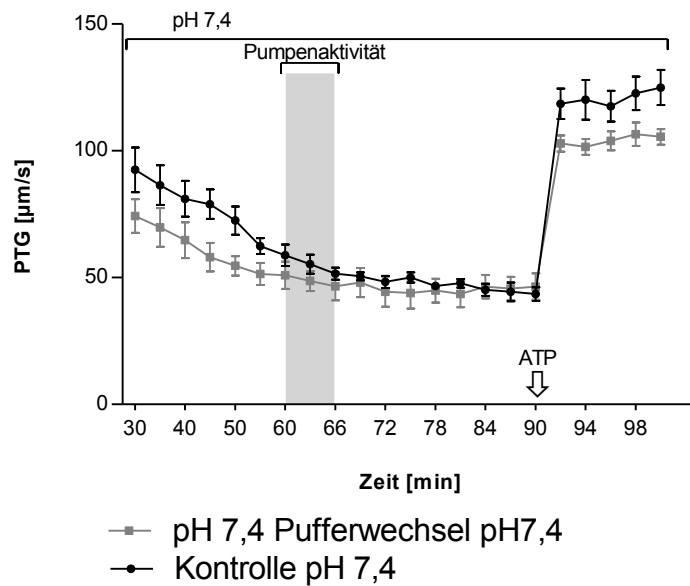


Abb. 3.1 *Effekt der Pumpe auf die Partikeltransportgeschwindigkeit*

Dargestellt ist die Auswirkung des induktionspumpenbedingten Austauschs der Pufferlösung. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) der Pufferwechsel durchgeführt. Eine Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. Es lässt sich erkennen, dass kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollversuchen besteht und die PTG nahezu konstant bleibt. (n=4, Mann-Whitney-U-Test)

Beim Pufferwechsel über die Pumpe kam es zu einem gleichmäßigen Abfall der ZSF von $16,96 \pm 1,27$ Hz (T60) auf $15,06 \pm 1,17$ Hz (T75) zu $14,07 \pm 0,95$ Hz (T90). Das Hinzufügen von $100 \mu\text{M}$ ATP führte zu einer Zunahme der Schlagfrequenz auf $32,72 \pm 0,97$ Hz (T100). Die Ergebnisse der Kontrollversuche zeigten mit $15,41 \pm 1,07$ Hz (T60), $12,82 \pm 0,65$ Hz (T75) und $11,86 \pm 0,39$ Hz (T90) einen vergleichbaren Verlauf. Zur Endgeschwindigkeit von $29,25 \pm 2,14$ Hz (100) kam es durch die Gabe von $100 \mu\text{M}$ ATP ($p > 0,05$, T75) (n=5, Abb. 3.2).

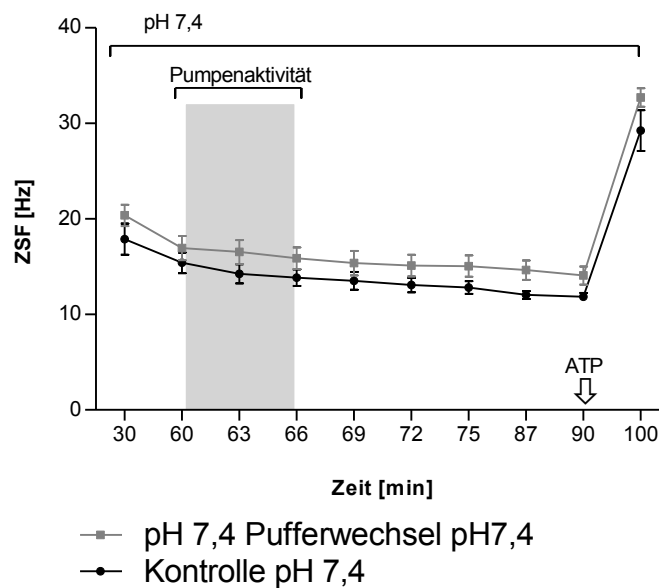


Abb. 3.2 *Effekt der Pumpe auf die Zilienschlagfrequenz*

Dargestellt ist die Auswirkung des Austauschs des HEPES-Ringer-Puffers unter Verwendung der Induktionspumpe auf die ZSF. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers durchgeführt. Eine Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. Ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollversuchen ist nicht erkennbar bei nahezu konstant bleibender ZSF. (n=5, Mann-Whitney-U-Test)

3.2 pH 5,0–8,0 und Wiedereinstellung auf pH 7,4 und damit verbundene Auswirkungen auf die Partikeltransportgeschwindigkeit

Der Pufferwechsel und die damit verbundene Änderung des pH-Wertes der Lösung haben einen Effekt auf die PTG. Bei Wiederherstellen des physiologischen pH-Wertes 7,4 durch HEPES-Ringer-Lösung veränderte sich die Geschwindigkeit und näherte sich der Geschwindigkeit der Kontrollversuche an. Die Änderung der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 5,0 führte zu einer hoch signifikanten Erniedrigung der PTG von $49,93 \pm 1,5 \mu\text{m/s}$ (T60) auf ein Minimum von $20,63 \pm 0,8 \mu\text{m/s}$ (T75). Nachdem der Puffer wieder auf pH-Wert 7,4 geändert wurde, stieg die Geschwindigkeit auf $43,02 \pm 0,6 \mu\text{m/s}$ (T90) an. Die Vitalitätskontrolle mit $100 \mu\text{M}$ ATP führte zu einer Endgeschwindigkeit von $113,2 \pm 13,12 \mu\text{m/s}$ (T100) ($p < 0,01$, T75) (n=5, Abb. 3.3).

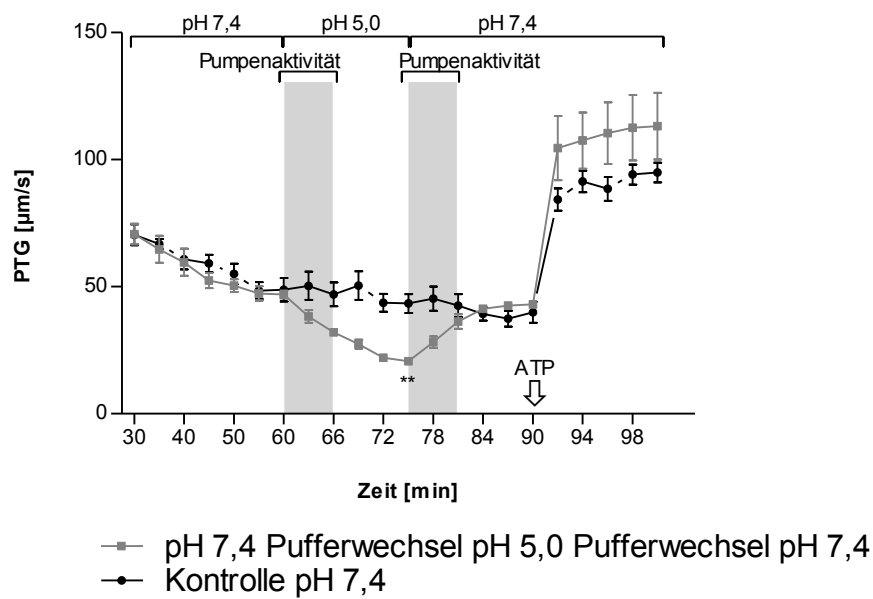


Abb. 3.3 Effekte des Pufferwechsels von pH 7,4 auf pH 5,0 und dem erneuten Wechsel auf pH 7,4
 Dargestellt ist die Auswirkung des Wechsels der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 5,0 und die anschließende Wiedereinstellung auf HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 unter Verwendung der Induktionspumpe. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers auf pH 5,0 durchgeführt. Dadurch kam es zu einer hochsignifikanten Abnahme der PTG. Durch den Wechsel auf den Ausgangspuffer mit pH 7,4 zu den Zeitpunkten T75, T78, T81 (grauer Balken) stieg die PTG wieder an. Eine Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. (** $p < 0,01$, $n=5$, Mann-Whitney-U-Test)

Die Umstellung der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 6,0 mit anschließendem erneuetem Wechsel auf pH 7,4 brachte keine signifikante Veränderungen der PTG mit sich. Die PTG fiel von $42,61 \pm 2,29 \mu\text{m/s}$ (T60) auf ein Minimum von $29,20 \pm 2,29 \mu\text{m/s}$ (T75) ab. Nach erneuter Änderung des Puffers auf pH-Wert 7,4 stieg die Geschwindigkeit auf $56,07 \pm 6,53 \mu\text{m/s}$ (T90). Die Kontrolle der Vitalität der Trachea mit $100 \mu\text{M}$ ATP führte zu einer Endgeschwindigkeit von $85,67 \pm 4,63 \mu\text{m/s}$ (T100) ($p > 0,05$, T75) ($n=5$, Abb. 3.4).

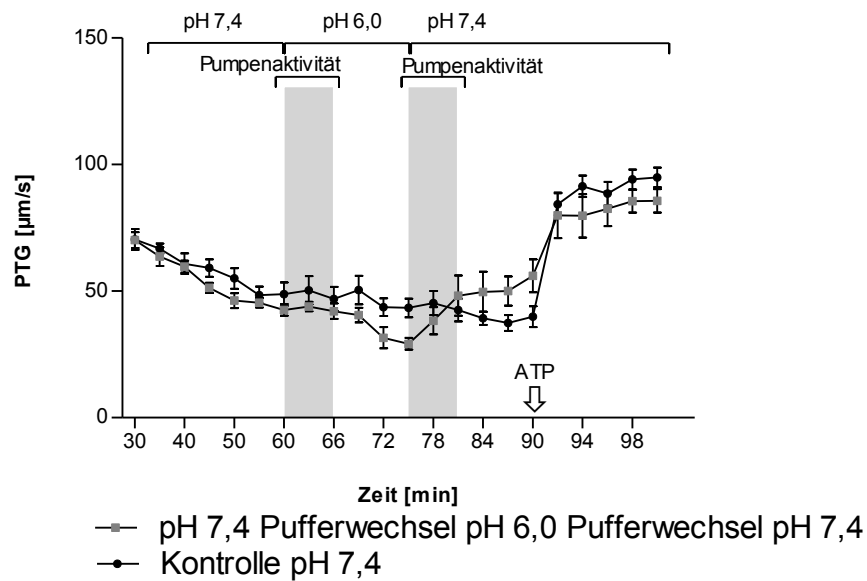


Abb. 3.4 Effekte des Pufferwechsels von pH 7,4 auf pH 6,0 und dem erneuten Wechsel auf pH 7,4
 Dargestellt ist die Auswirkung des Wechsels der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 6,0 und die anschließende Wiedereinstellung auf pH 7,4 unter Verwendung der Induktionspumpe. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers auf pH 6,0 durchgeführt. Die Kontrollversuche wiesen den gleichen Aufbau auf mit dem Unterschied, dass ausschließlich HEPES-Ringer-Puffer pH 7,4 bei allen Pufferwechseln verwendet wurde. Dadurch kam es allerdings zu keiner signifikanten Veränderung der PTG. Zu den Zeitpunkten T75, T78, T81 (grauer Balken) erfolgte der Wechsel auf den Ausgangspuffer mit pH 7,4. Eine Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. (n=5, Mann-Whitney-U-Test)

Der Austausch der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 7,0 führte nicht zu signifikanten Veränderungen der PTG. Es folgte eine stetige Verlangsamung von $46,60 \pm 2,72 \mu\text{m/s}$ (T60) auf $39,40 \pm 1,84 \mu\text{m/s}$ (T75). Nach erneutem Wechsel des Puffers auf pH-Wert 7,4 änderte sich die Geschwindigkeit auf $43,14 \pm 1,0 \mu\text{m/s}$ (T90). Die Kontrolle der Vitalität der Trachea mit $100 \mu\text{M}$ ATP führte zu einer Endgeschwindigkeit von $78,03 \pm 7,29 \mu\text{m/s}$ (T100) ($p > 0,05$, T75) (n=5, Abb. 3.5).

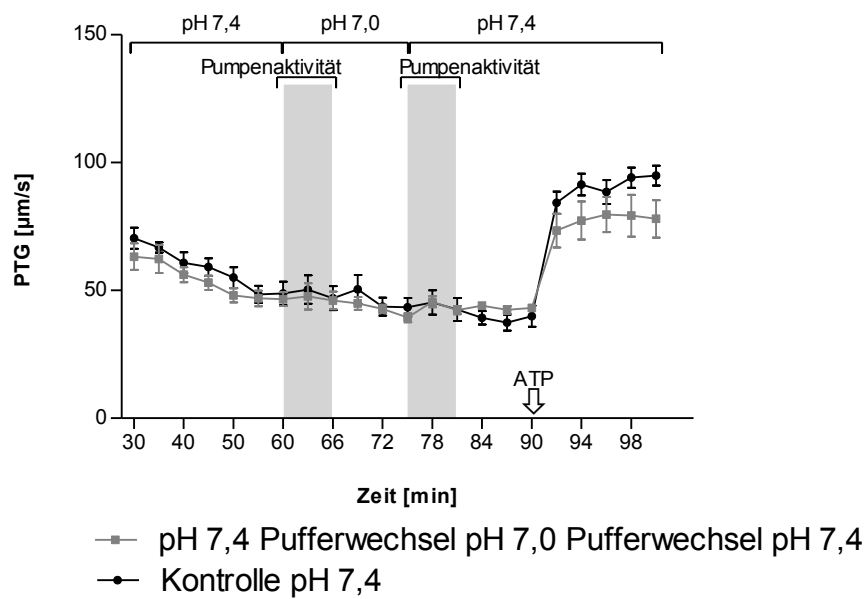


Abb. 3.5 *Effekte des Pufferwechsels von pH 7,4 auf pH 7,0 und dem erneuten Wechsel auf pH 7,4*
Dargestellt ist die Auswirkung des Wechsels des HEPES-Ringer-Puffers pH 7,4 auf MES-Ringer-Lösung pH 7,0 und die anschließende Wiedereinstellung auf HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 unter Verwendung der Induktionspumpe. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers auf pH 7,0 durchgeführt. Die Kontrollversuche wiesen den gleichen Aufbau auf mit dem Unterschied, dass ausschließlich HEPES-Ringer-Puffer pH 7,4 bei allen Pufferwechseln verwendet wurde. Dadurch kam es im Vergleich zur Kontrolle zu keiner Änderung der PTG. Der Wechsel auf die Ausgangspufferlösung mit pH 7,4 zu den Zeitpunkten T75, T78, T81 (grauer Balken) brachte ebenfalls keine signifikanten Änderungen der Geschwindigkeit mit sich. Eine Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. (n=5, Mann-Whitney-U-Test)

Die Änderung der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 8,0 führte zu einer hoch signifikanten Erhöhung der PTG von $56,95 \pm 6,42 \mu\text{m/s}$ (T60) auf $80,72 \pm 8,98 \mu\text{m/s}$ (T75) und auf ein Maximum von $85,19 \pm 9,68 \mu\text{m/s}$ (T81). Nachdem der Puffer wieder auf pH-Wert 7,4 geändert wurde, fiel die Geschwindigkeit auf $67,75 \pm 7,15 \mu\text{m/s}$ (T90) ab. Die Vitalitätskontrolle mit $100 \mu\text{M}$ ATP führte zu einer Endgeschwindigkeit von $102,1 \pm 11,32 \mu\text{m/s}$ (T100) ($p < 0,01$ T75) (n=5, Abb. 3.6).

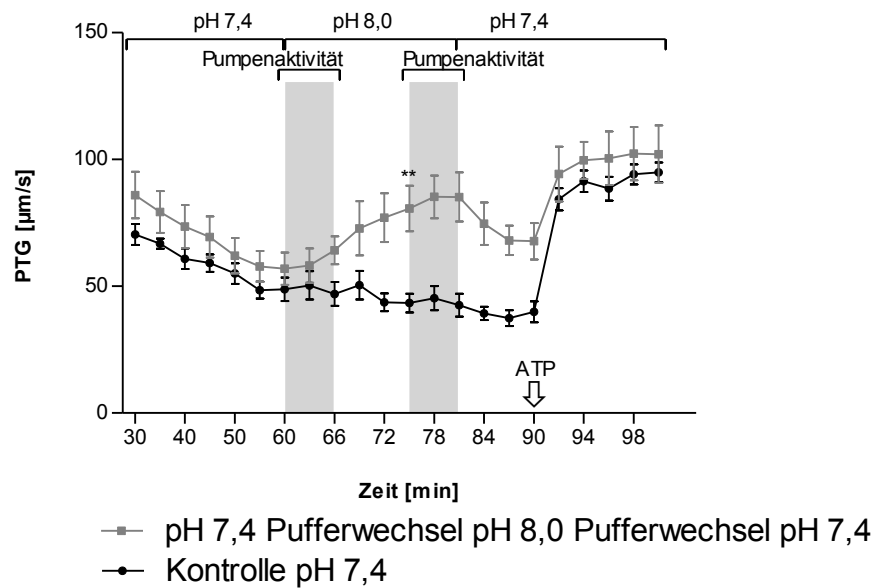


Abb. 3.6 *Effekte des Pufferwechsels von pH 7,4 auf pH 8,0 und dem erneuten Wechsel auf pH 7,4*
Dargestellt ist die Auswirkung des Wechsels des HEPES-Ringer-Puffers pH 7,4 auf CAPSO-Ringer-Lösung pH 8,0 und die anschließende Wiedereinstellung auf pH 7,4 unter Verwendung der Induktionspumpe. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers auf pH 8,0 durchgeführt. Die Kontrollversuche wiesen den gleichen Aufbau auf mit dem Unterschied, dass ausschließlich HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 bei allen Pufferwechseln verwendet wurde. Dadurch kam es zu einer hochsignifikanten Zunahme der PTG. Durch den Wechsel auf den Ausgangspuffer mit pH 7,4 zu den Zeitpunkten T75, T78, T81 (grauer Balken) sank die PTG wieder ab. Eine Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. (** $p < 0,01$, $n=5$, Mann-Whitney-U-Test)

3.3 Effekte verschiedener pH-Werte auf die Partikeltransportgeschwindigkeit

Bei der Betrachtung des Einflusses des Pufferwechsels auf die PTG 15 Minuten nach Austausch des initialen Puffers mit dem pH 7,4 gegen Puffer mit pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0 oder pH 8,0 lassen sich Veränderungen auf die Transportgeschwindigkeit erkennen (Abb. 3.7).

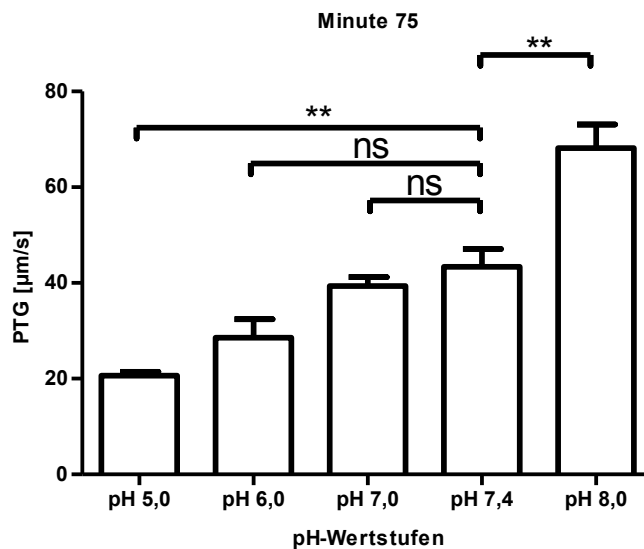


Abb. 3.7 Der Einfluss des Pufferwechsels auf die Partikeltransportgeschwindigkeit 15 Minuten nach Austausch des initialen Puffers mit dem pH 7,4 gegen Puffer mit pH 5, pH 6, pH 7, pH 7,4 oder pH 8 mit Veränderung der Transportgeschwindigkeit (** $p < 0,01$, Mann-Whitney-U-Test)

3.4 Einfluss azider oder alkalischer pH-Werte auf die Zilienschlagfrequenz

Der Wechsel des pH-Wertes hat einen Effekt auf die ZSF. Beim Wechsel der Pufferlösung mit pH-Wert 7,4 auf pH 5,0 kam es zu einer Reduktion der ZSF. Die unter Kontrollbedingungen bei pH 7,4 in Ruhe gemessene ZSF von $14,18 \pm 1,20$ Hz (T60) sank über $8,06 \pm 0,48$ Hz (T75) bis auf $5,83 \pm 0,79$ Hz (T90) ab. Eine Überprüfung der Vitalität mit $100 \mu\text{M}$ ATP führte zu einer Erhöhung der Frequenz auf $14,73 \pm 1,96$ Hz (T100). Diese Erhöhung der endgültigen Frequenz ist im Vergleich zu den Kontrollversuchen deutlich erniedrigt (T100). Die Vitalitätsprüfung führte hier bei einem Ausgangswert von $11,86 \pm 0,39$ Hz (T90) zu einer Endfrequenz von $29,25 \pm 2,14$ Hz (T100) ($p < 0,01$ T75) ($n=5$, Abb. 3.8).

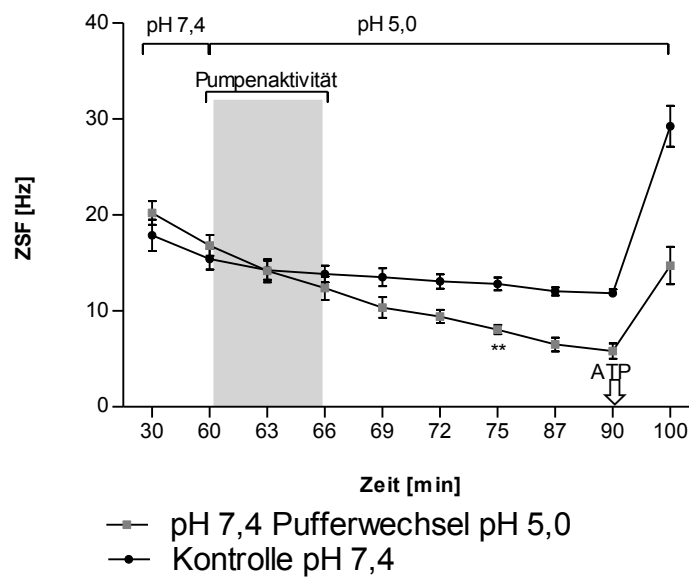


Abb. 3.8 *Effekte des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Werte 5,0 auf die Zilienschlagfrequenz*
 Dargestellt ist die Auswirkung des Wechsels der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 5,0 unter Verwendung der Micro-Perfusions-Pumpe. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers auf pH 5,0 durchgeführt. Dadurch kam es zu einer hochsignifikanten Abnahme der ZSF. Auch die Kontrolle der Vitalität mit ATP zum Zeitpunkt T90 führte dabei zu einer langsameren Endgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle. Die Kontrollversuche wiesen den gleichen Aufbau auf mit dem Unterschied, dass ausschließlich HEPES-Ringer-Puffer pH 7,4 bei allen Pufferwechseln verwendet wurde. (** $p < 0,01$, $n = 5$, Mann-Whitney-U-Test)

Bei der Veränderung der Pufferlösung mit pH-Wert 7,4 auf pH 8,0 kam es zu einer Erhöhung der ZSF. Die zu Anfang bestimmte Schlagfrequenz von $14,84 \pm 0,96$ Hz (T60) stieg über $21,73 \pm 1,99$ Hz (T75) bis auf ein Maximum von $23,98 \pm 1,85$ Hz (T90) an. Obwohl der pH-Wert bereits auf den Zielwert von 8,0 eingestellt wurde, konnte ein weiterer Anstieg der Frequenz beobachtet werden. Die Zunahme der Schlagfrequenz erreichte dabei kein Plateau, sondern stieg stetig über den Beobachtungszeitraum an. Eine Überprüfung der Vitalität mit $100 \mu\text{M}$ ATP führte zu einer Endfrequenzanstieg von $32,31 \pm 1,46$ Hz (T100) ($p < 0,01$ T75) ($n = 5$, Abb. 3.9).

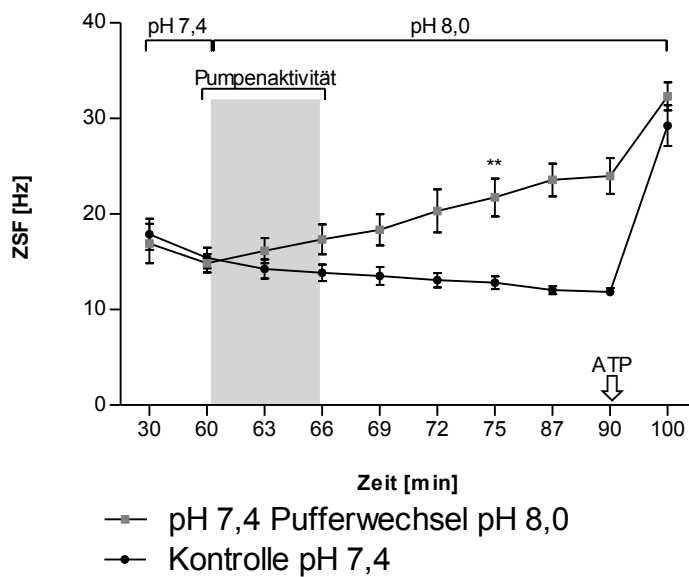


Abb. 3.9 *Effekte des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Werte 8,0 auf die Zilienschlagfrequenz*
Dargestellt ist die Auswirkung des Wechsels der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 8,0 unter Verwendung der Induktionspumpe. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers auf pH 8,0 durchgeführt. Die Kontrollversuche wiesen den gleichen Aufbau auf mit dem Unterschied, dass ausschließlich HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 bei allen Pufferwechseln verwendet wurde. Durch den Wechsel auf pH 8,0 kam es über den Beobachtungszeitraum zu einer hochsignifikanten, stetigen Zunahme der ZSF, die gegen Ende abflachte. Die Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. (** $p < 0,01$, $n=5$, Mann-Whitney-U-Test)

3.5 Pufferwechsel auf pH-Wert 6,0 und 8,0 und der Effekt auf die Partikeltransportgeschwindigkeit

Der Wechsel des Puffers und die damit verbundene Änderung des pH-Wertes in basische oder azide Bereiche beeinflusst die PTG. Beim Wechsel der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 6,0 kam es zu einer Erniedrigung der PTG. Die anfängliche Geschwindigkeit von $48,55 \pm 3,29 \mu\text{m/s}$ (T60) sank über $28,57 \pm 3,88 \mu\text{m/s}$ (T75) bis auf $24,47 \pm 1,46 \mu\text{m/s}$ ab. Die Überprüfung der Vitalität mit $100 \mu\text{M}$ ATP führte zu einer Endgeschwindigkeit von $97,59 \pm 9,12 \mu\text{m/s}$ (T100) ($p < 0,01$ T75) ($n=6$, Abb. 3.10).

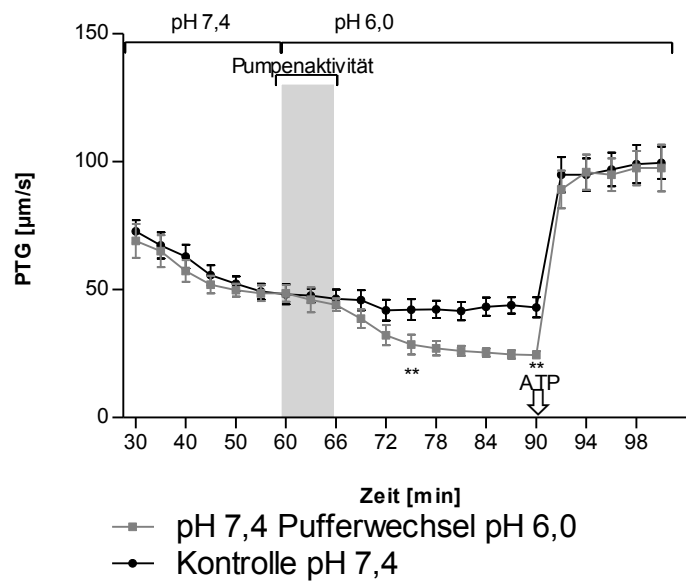


Abb. 3.10 Effekte des Pufferwechsels von pH 7,4 auf pH 6,0

Dargestellt ist die Auswirkung des Wechsels der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 6,0 unter Verwendung der Induktionspumpe. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers auf pH 6,0 durchgeführt. Die Kontrollversuche wiesen den gleichen Aufbau auf mit dem Unterschied, dass ausschließlich HEPES-Ringer-Puffer pH 7,4 bei allen Pufferwechseln verwendet wurde. Durch den Wechsel auf pH 6,0 kam es zu einer Abnahme der PTG. Eine Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. (** $p < 0,01$, $n=6$, Mann-Whitney-U-Test)

Beim Wechsel der Pufferlösung mit pH-Wert 7,4 auf pH 8,0 kam es zu einer Erhöhung der PTG. Die anfangs gemessene Geschwindigkeit von $48,87 \pm 4,13 \mu\text{m/s}$ (T60) stieg über $68,18 \pm 4,92 \mu\text{m/s}$ (T75) bis auf $73,97 \pm 6,25 \mu\text{m/s}$ (T90) an. Der pH-Wert wurde auf den Zielwert von 8,0 eingestellt. Die Zunahme der Schlagfrequenz erreichte dabei eine kurze Plateauphase und stieg stetig über den gesamten Beobachtungszeitraum an. Überprüfung der Vitalität mit $100 \mu\text{M}$ ATP führte zu einer Zunahme der Geschwindigkeit auf $97,04 \pm 13,53 \mu\text{m/s}$ (T100) ($p < 0,05$, T75) ($n=6$, Abb. 3.11).

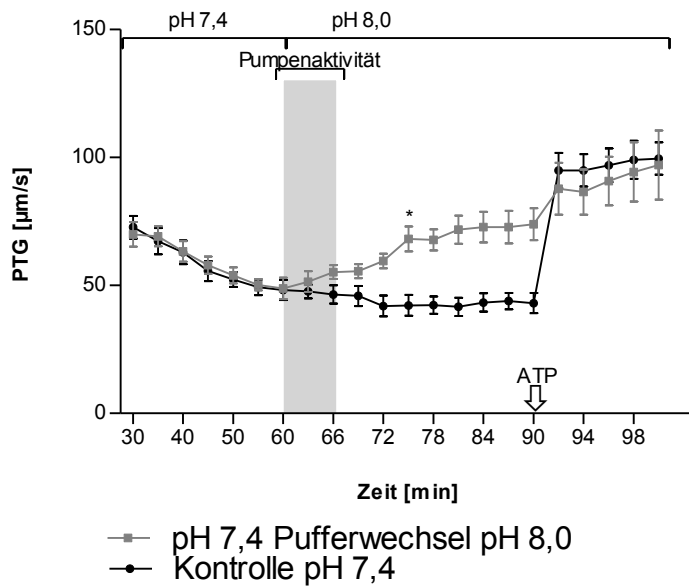


Abb. 3.11 Wirkungen des Pufferwechsels von pH 7,4 auf pH 8,0

Dargestellt ist die Auswirkung des Wechsels des HEPES-Ringer-Puffers pH 7,4 auf pH 8,0 unter Verwendung der Induktionspumpe. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers auf pH 8,0 durchgeführt. Die Kontrollversuche wiesen den gleichen Aufbau auf mit dem Unterschied, dass ausschließlich HEPES-Ringer-Puffer pH 7,4 bei allen Pufferwechseln verwendet wurde. Durch den Wechsel auf pH 8,0 kam es zu einer stetigen Zunahme der PTG. Eine Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. (* $p < 0,05$, $n = 6$, Mann-Whitney-U-Test)

Die durch pH-Wert 8,0 induzierte Erhöhung der ZSF korrelierte stark mit der beobachteten Erhöhung der PTG unter selbigem pH-Wert ($r = 0,7818$). Gleiches gilt für eine durch pH-Wert 5,0 induzierte Erniedrigung der ZSF, welche ebenfalls sehr stark mit dem Abfall der PTG bei pH-Wert 5,0 korreliert ($r = 1,0$). Auch der Wechsel der Pufferlösung bei pH-Wert 7,4 unter Benutzung der Induktionspumpe zeigte eine Korrelation zwischen PTG und ZSF ($r = 0,9429$). Die zur Ermittlung der jeweiligen Korrelation verwendeten Daten setzten sich aus den Mittelwerten der Messzeitpunkte T60, T63, T66, T69, T72, T75 zusammen. Dieser Zeitraum wurde aufgrund der Tatsache gewählt, dass bei T60 mit dem pumpengesteuerten Wechsel der Pufferlösung begonnen wurde, und bei T75 der Ausgangswert von pH 7,4 wieder eingestellt wurde. Somit wurde eine längstmögliche Exposition der Zellen gegenüber der jeweiligen pH-Werte erreicht. Die Daten der Versuche der ZSF und PTG nach entsprechendem Wechsel wurden mittels eines Spearman-Tests untersucht. Es zeigte

sich ein positiver Korrelationskoeffizient (Abb. 3.12, Abb. 3.13 und Abb. 3.14, jeweils $n=4$). Dies zeigte, dass mit der Stimulation der ZSF durch pH-Wertwechsel ins Azide bzw. Basische eine Stimulation der PTG einhergeht. Zusätzlich zeigt sich, dass die Pumpe sowohl auf die PTG als auch auf die ZSF keine Auswirkung hat.

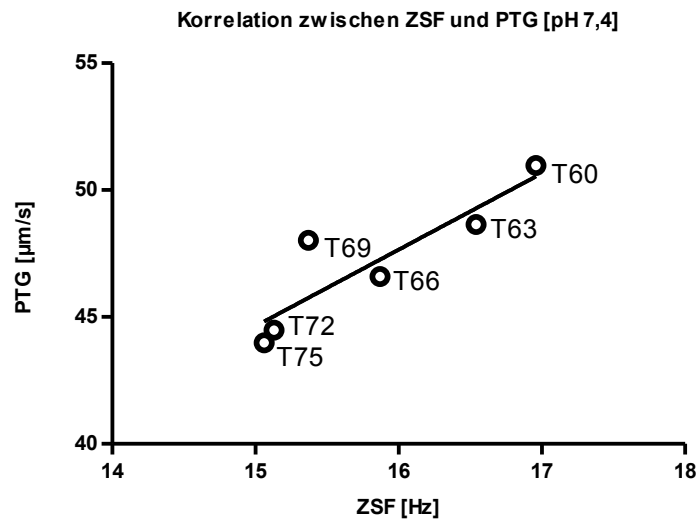


Abb. 3.12 Korrelation zwischen Zilienschlagfrequenz und Partikeltransportgeschwindigkeit für pumpengesteuerten Pufferwechsel bei pH-Wert 7,4 anhand der Mittelwerte der Messzeitpunkte T60, T63, T66, T69, T72, T75. Die PTG korrelierte sehr stark mit der ZSF, dies indizierte der Korrelationskoeffizient von $r=0,9429$, $n=4$.

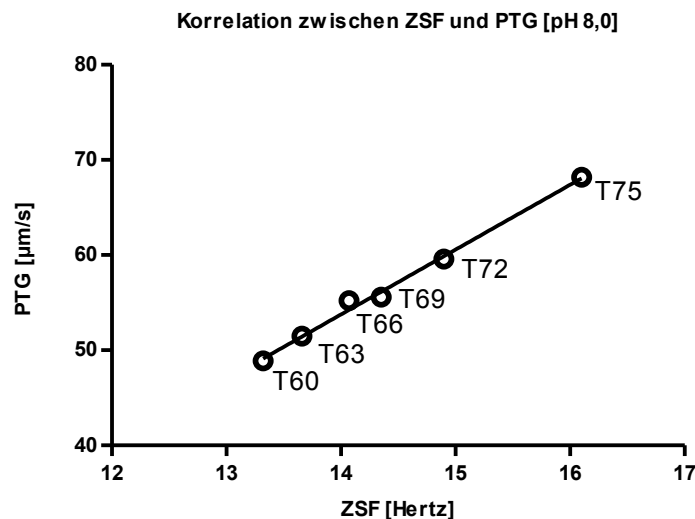


Abb. 3.13 Korrelation zwischen Zilienschlagfrequenz und Partikeltransportgeschwindigkeit für pH 8,0 anhand der Mittelwerte der Messzeitpunkte T60, T63, T66, T69, T72, T75. Die PTG korrelierte stark mit dem Anstieg der ZSF, welches der Korrelationskoeffizient von $r=0,7818$ indizierte, $n=4$.

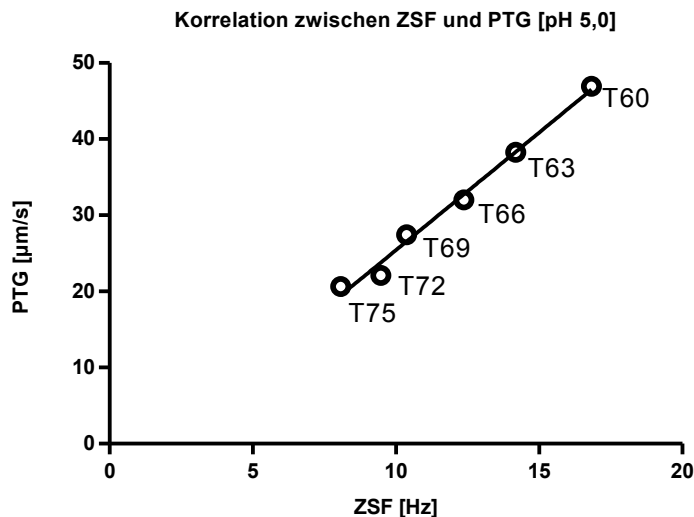


Abb. 3.14 Korrelation zwischen Zilienschlagfrequenz und Partikeltransportgeschwindigkeit für pH 5,0 anhand der Mittelwerte der Messzeitpunkte T60, T63, T66, T69, T72, T75. Die PTG korrelierte sehr stark mit dem Anstieg der ZSF, dies indizierte der Korrelationskoeffizient von $r=1,0$, $n=4$.

3.6 Effekte der Hemmung von Protonenaustauschern auf die Zilienschlagfrequenz

Mit diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob das Trachealepithel durch zelluläre pH-Regulationsmechanismen fähig ist, auch bei Hemmung von Protonenpumpenaustauschern den physiologischen pH-Wert wieder herzustellen. Die Hemmung wurde dabei mit den Pharmaka Amilorid, welches epithelial-gelegene Natrium-Kanäle (ENaC) direkt blockiert, und DiDs, das als Anionen-Austauscher-Inhibitor fungiert und Kanäle wie beispielsweise den Chlorid-Bikarbonat-Austauscher hemmt, durchgeführt. In diesen Versuchen wurde der Effekt auf die ZSF bei Anwesenheit von 150 μM DiDs sowie in Kombination 100 μM Amilorid untersucht. Bei Zugabe von 150 μM DiDs in HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4. Es gab dabei keine signifikanten Änderungen. Die zu Anfang bestimmte Schlagfrequenz von 19,37 \pm 0,48 Hz (T60) änderte sich langsam über 15,59 \pm 0,66 Hz (T75) auf 14,08 \pm 0,52 Hz (T90). Die Vitalität wurde mit 100 μM ATP kontrolliert und führte

zu einer Endfrequenzanstieg von $31,20 \pm 0,39$ Hz (T100). ($p > 0,05$, T75) ($n=4$, Abb. 3.15).

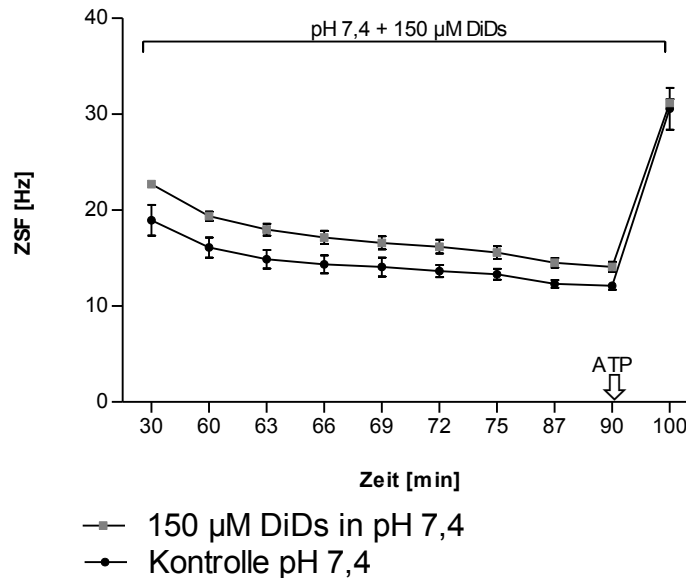


Abb. 3.15 *Wirkungen der Inhibition des Anionen-Austauscher auf die Zilienschlagfrequenz*
Dargestellt ist die Auswirkung der Inhibition des Anionen-Austauscher mittels DiDs auf die ZSF in HEPES-Ringer-Puffer pH 7,4. DiDs wurde zu Versuchsbeginn in die Lösung gegeben. Es gab keine signifikanten Veränderungen. Eine Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. ($n=4$, Mann-Whitney-U-Test)

Bei Hinzufügen der Inhibitoren der epithelial-gelegenen Natrium-Protonen-Austauscher sowie der Anionen-Austauscher in HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 zum Versuchsstart waren keine Veränderungen der ZSF zu beobachten. Die anfangs gemessene Schlagfrequenz von $17,32 \pm 1,07$ Hz (T60) verlief über den Beobachtungszeitraum nahezu konstant mit lediglich minimalen Veränderungen ($17,36 \pm 0,66$ Hz (T75)). Ein nicht signifikanter Anstieg auf $19,24 \pm 0,73$ Hz (T87) mit einem Trend zu einer leicht erhöhten ZSF mit einer Frequenz von $19,74 \pm 0,49$ Hz (T90) konnte vor der Vitalitätskontrolle beobachtet werden. Deren Kontrolle mit $100 \mu\text{M}$ ATP führte zu einem Frequenzanstieg auf $30,89 \pm 0,88$ Hz (T100) ($p > 0,05$, T75) ($n=4$, Abb. 3.16).

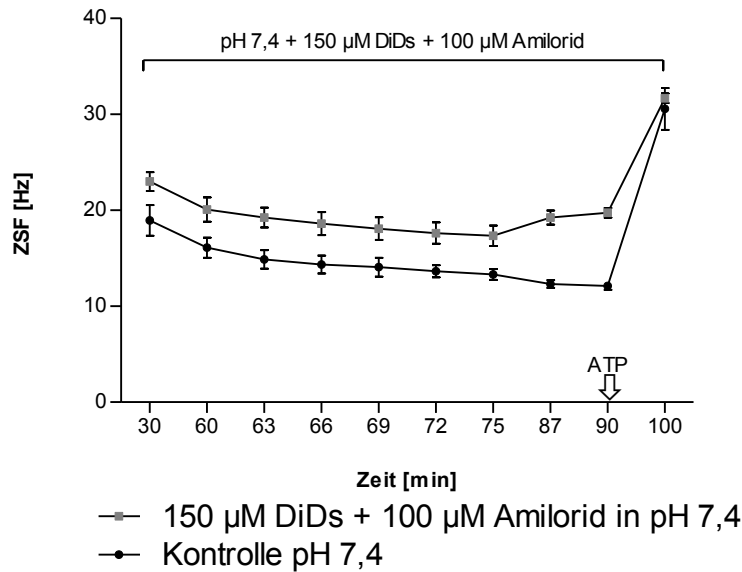


Abb. 3.16 Wirkungen der Natrium-Protonen- und Anionen-Austauscher-Inhibition auf die Zilienschlagfrequenz

Dargestellt ist die Auswirkung des Anionen-Austauscher-Inhibitors DiDs und des Natrium-Kanal Inhibitors Amilorid auf die ZSF in HEPES-Ringer-Puffer pH 7,4. DiDs und Amilorid wurden zu Versuchsbeginn in die Lösung gegeben. Es gab hierbei jedoch keine Unterschiede. Eine Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. (n=4, Mann-Whitney-U-Test)

3.7 Effekte und Reversibilität der Inhibition des Natrium-Kanals bei pH 5,0 und pH 7,4 auf die Partikeltransportgeschwindigkeit

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Wechsel der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 5,0 Einfluss auf die PTG hatte, wurde mit Amilorid die ENaC-Aktivität blockiert. Dazu wurden 100 µM Amilorid, gelöst in 2 µl DMSO nach dem Einstellen von pH-Wert 5,0 bei T69 hinzugefügt. Im Anschluss wurde bei T75 die Lösung mit pH 5,0 durch den HEPES-Ringer-Puffer pH 7,4 mit 100 µM Amilorid ausgetauscht. Bei der Änderung der Pufferlösung mit pH-Wert 7,4 auf pH 5,0 bei Anwesenheit von 100 µM Amilorid zeigte sich eine reduzierte Erholung der PTG im Vergleich zu pH 5,0 ohne Amilorid. Die zu Beginn gemessene Partikelgeschwindigkeit von $47,35 \pm 1,96 \mu\text{m/s}$ (T60) sank über $21,64 \pm 0,92 \mu\text{m/s}$ (T75) auf ein Minimum von $20,25 \pm 1,65 \mu\text{m/s}$ (T78). Nachdem der Puffer wieder auf pH-Wert 7,4 mit 100 µM Amilorid geändert wurde, stieg die Geschwindigkeit auf $28,75 \pm 1,42 \mu\text{m/s}$ (T90) an. Die Vitalitätskontrolle mit 100 µM ATP führte zu einer Endgeschwindigkeit von

79,18 \pm 2,79 $\mu\text{m/s}$ (T100). Die daraus resultierende Endgeschwindigkeit imponierte im Vergleich zu den Kontrollversuchen niedriger, der Unterschied war dabei aber nicht signifikant. Die Vitalitätsprüfung führte hier bei einem Ausgangswert von 39,94 \pm 4,10 $\mu\text{m/s}$ (T90) zu einer Endgeschwindigkeit von 94,92 \pm 3,87 $\mu\text{m/s}$ (T100) ($p > 0,05$ T75) ($n=5$, Abb. 3.17).

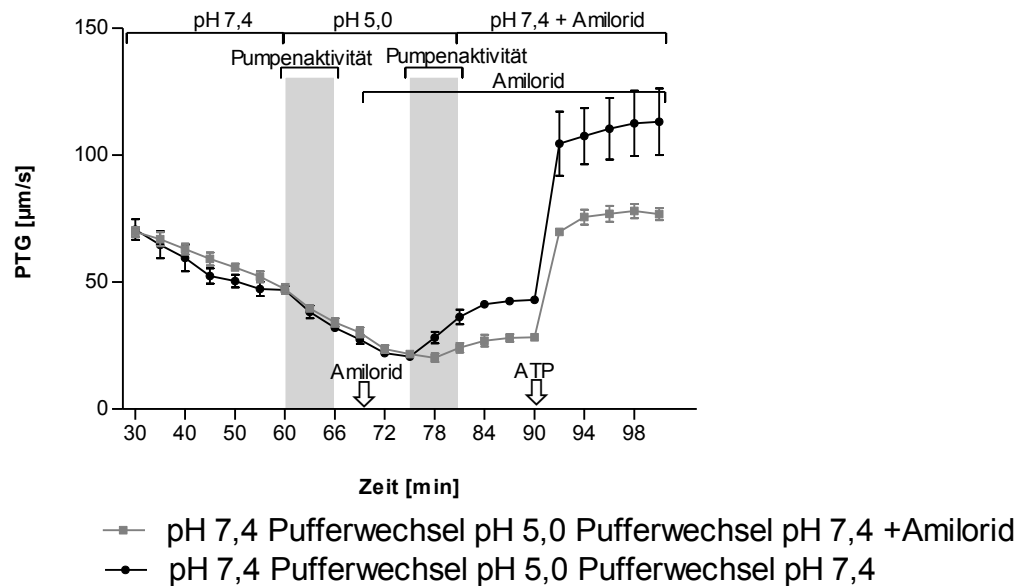


Abb. 3.17 Wirkungen des Pufferwechsels von pH 7,4 auf pH 5,0 mit Natrium-Kanal-Inhibition und dem erneuten Wechsel auf pH 7,4 mit Natrium-Kanal-Inhibition

Dargestellt ist die Auswirkung des Wechsels der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 5,0 unter Zugabe von Amilorid und die darauf folgende Änderung auf HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 mit Amilorid in der Pufferlösung pH 7,4 unter Verwendung der Induktionspumpe. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers auf pH 5,0 durchgeführt, wodurch die PTG abfiel. Zum Zeitpunkt T69 wurde Amilorid hinzugefügt. Durch den erneuten Wechsel des Puffers auf pH 7,4 mit Amilorid in der Lösung zu den Zeitpunkten T75, T78, T81 (grauer Balken) stieg die PTG wieder an. Bei den Kontrollversuchen erfolgte der Wechsel der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 5,0 mit anschließendem erneutem Wechsel auf pH 7,4. Bei allen Pufferwechseln, die durchgeführt wurden, erfolgte keine Applikation von Amilorid. Eine Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. ($n=5$, Mann-Whitney-U-Test)

Wie sich die PTG bei erneutem Auswaschen mit HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 veränderte, konnte mit der Ergänzung eines weiteren pumpengesteuerten Pufferwechsels gezeigt werden. Die anfangs bestimmte PTG von $45,62 \pm 2,15 \mu\text{m/s}$ (T60) sank über $18,34 \pm 0,99 \mu\text{m/s}$ (T75) auf $17,94 \pm 0,84 \mu\text{m/s}$ (T78) ab. Nachdem der Puffer wieder auf pH-Wert 7,4 mit $100 \mu\text{M}$ Amilorid geändert wurde, stieg die Geschwindigkeit auf $37,68 \pm 1,74 \mu\text{m/s}$ (T90) an. Nachdem der HEPES-Ringer-Puffer pH 7,4 mit $100 \mu\text{M}$ Amilorid durch HEPES-Ringer-Puffer pH 7,4 ausgetauscht wurde, erholte sich die PTG gleichmäßig $31,09 \pm 1,07 \mu\text{m/s}$ (T105). Die Vitalitätskontrolle mit $100 \mu\text{M}$ ATP führte zu einer Endgeschwindigkeit von $92,32 \pm 6,73 \mu\text{m/s}$ (T115) ($p > 0,05$, T105) ($n=5$, Abb. 3.18)

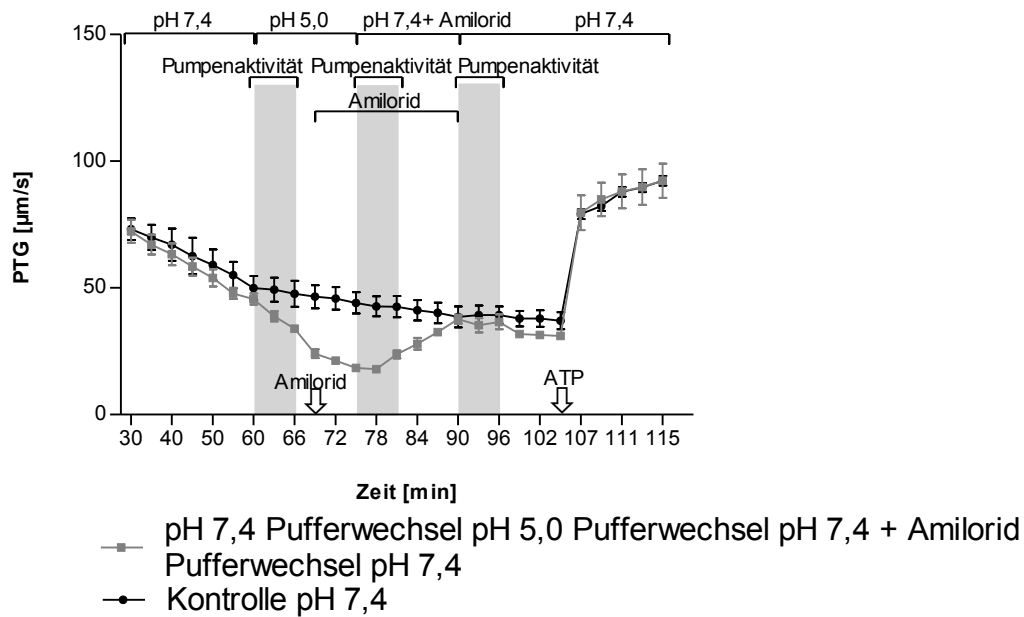


Abb. 3.18 Effekte des Pufferwechsels von pH 7,4 auf pH 5,0 mit Natrium-Kanal-Inhibition und dem erneuten Wechsel auf pH 7,4 mit Natrium-Kanal-Inhibition, gefolgt von Pufferwechsel auf pH 7,4. Dargestellt ist die Auswirkung des endgültigen Auswaschens von Amilorid. Durchgeführt wurde hierbei der Wechsel der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 5,0 unter Zugabe von Amilorid, die darauf folgende Änderung auf HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 mit Amilorid in der Pufferlösung und die anschließende Wiedereinstellung auf HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 unter Verwendung der Induktionspumpe. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers auf pH 5,0 durchgeführt. Hierauf sank die PTG ab. Zum Zeitpunkt T69 wurde Amilorid hinzugefügt. Durch den erneuten Wechsel des Puffers auf pH 7,4 mit Amilorid in der Lösung zu den Zeitpunkten T75, T78, T81 (grauer Balken) stieg die PTG an. Der letzte Wechsel, der zur Auswaschung von Amilorid und der Wiederherstellung des Ausgangspuffers mit pH 7,4 führte, erfolgte zu den Zeitpunkten T90, T93, T96 (grauer Balken). Die Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T105. Das endgültige Auswaschen von Amilorid hat hierbei keine Auswirkung auf die PTG und das Geschwindigkeitsniveau völlig unbehandelter Tracheen dabei erreicht. Die Kontrollversuche wiesen den gleichen Aufbau auf mit dem Unterschied, dass ausschließlich HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 bei allen Pufferwechseln zur Anwendung kam und kein Amilorid appliziert wurde. (n=5, Mann-Whitney-U-Test)

Ein direkt die PTG reduzierender Effekt durch Amilorid konnte nicht gezeigt werden. Beim direkten Vergleich der PTG in pH 5,0 mit pH 5,0 und zugegebenen 100 μM Amilorid zeigte sich eine hoch signifikant langsamere Erholung der PTG ($p < 0,01$, T84) (n=5, Abb. 3.19). Diesbezüglich ist die hemmende Auswirkung auf die Beschleunigung der PTG durch den pumpengesteuerten Wechsel der

Pufferlösung pH 7,4 auf pH 5,0 unter Zugabe von Amilorid in Abbildung 3.20 dargestellt.

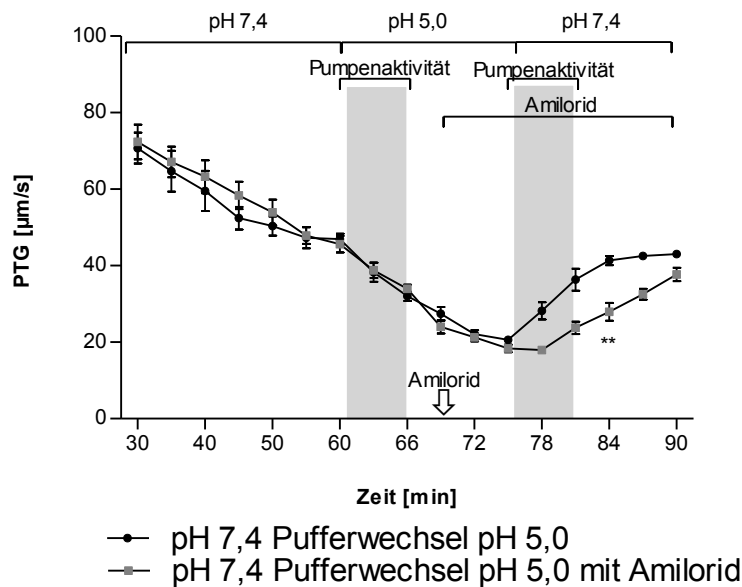


Abb. 3.19 Auswirkungen der Natrium-Kanal-Inhibition auf die Erholung der Partikeltransportgeschwindigkeit

Dargestellt ist die Auswirkung des pumpengesteuerten Wechsels der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 5,0 unter Zugabe von Amilorid. Darauf folgte die Änderung auf HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 mit Amilorid in der Pufferlösung pH 7,4. Verglichen wird hierbei mit dem identischen Versuchsablauf, der nur ohne Amilorid durchgeführt wurde. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers auf pH 5,0 durchgeführt. Durch den Wechsel kam es zu einer Abnahme der PTG. Zum Zeitpunkt T69 wurde Amilorid hinzugefügt. Durch den erneuten Wechsel des Puffers auf pH 7,4 mit Amilorid in der Lösung zu den Zeitpunkten T75, T78, T81 (grauer Balken) stieg die PTG wieder an. Durch den Zusatz von Amilorid kommt es beim Wechsel von pH 5,0 auf pH 7,4 zu einer langsameren Erholung der Geschwindigkeit. (** $p < 0,01$, $n=5$, Mann-Whitney-U-Test)

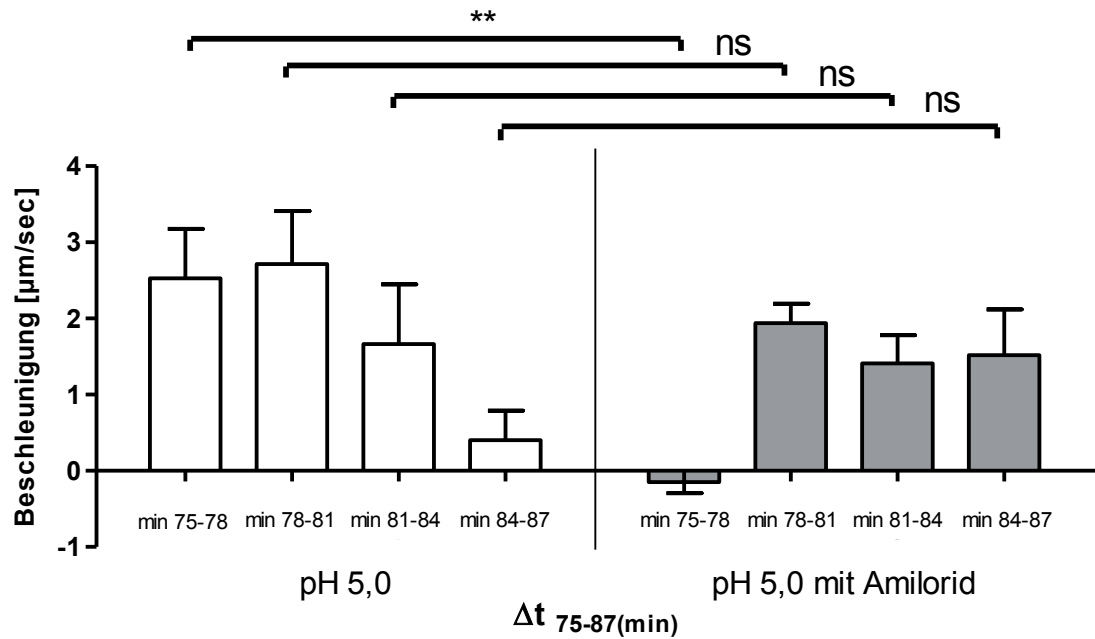


Abb. 3.20 Auswirkungen der Natrium-Kanal-Inhibition auf die Beschleunigung der Partikeltransportgeschwindigkeit

Dargestellt ist die hemmende Auswirkung auf die Beschleunigung der PTG durch den pumpengesteuerten Wechsel der Pufferlösung pH 7,4 auf pH 5,0 unter Zugabe von Amilorid. Darauf folgte die Änderung auf HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 mit Amilorid in der Pufferlösung pH 7,4. Verglichen wird hierbei mit dem identischen Versuchsablauf, der nur ohne Amilorid durchgeführt wurde. Abgebildet sind die Untersuchungszeiträume zwischen T75–T 87. (** $p < 0,01$, Mann-Whitney-U-Test)

3.8 Effekte der Inhibition der Protonenaustauscher auf die Zilienschlagfrequenz bei Zusatz von NH_4Cl

Die Umstellung der Pufferlösung pH 7,4 bei hinzugefügten 150 μM DiDs, sowie 150 μM DiDs und 100 μM Amilorid in Kombination auf HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 mit Zusatz von 10 mM NH_4Cl ebenfalls mit 150 μM DiDs und der Kombination von 150 μM DiDs und 100 μM Amilorid mit anschließender Wiedereinstellung der ursprünglichen Lösung mit den entsprechenden Substanzen und die Wirkung auf die ZSF wurde in diesem Versuchsaufbau untersucht. Die alleinige Wirkung von 10 mM NH_4Cl bei pH-Wert 7,4 auf die ZSF wurde ebenfalls überprüft. NH_4Cl war dabei bereits zu Versuchsbeginn appliziert worden. Die ZSF verläuft dabei unruhig mit Frequenzen von 17,33 \pm 0,94 Hz (T60) auf ein Maximum von 18,63 \pm 1,27 Hz

(T75). Dabei kommt es zu keinen signifikanten Abweichungen. Die Kontrolle der Vitalität des Trachealepithels mit 100 μM ATP führte zu einer Endfrequenz von 28,09 \pm 0,55 Hz (T100) ($p > 0,05$, T75) ($n=4$, Abb. 3.21).

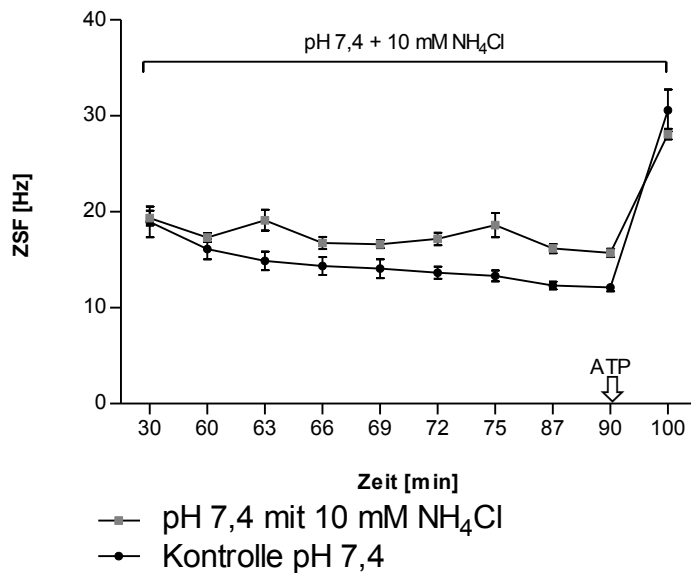


Abb. 3.21 Auswirkungen auf die Zilienschlagfrequenz bei Zusatz von NH_4Cl

Dargestellt ist die Auswirkung der HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 unter Zusatz von NH_4Cl , welches während der gesamten Versuchsdauer in der Pufferlösung vorhanden war. Es ist im Verlauf eine unruhigere Kurve zu erkennen in der passagere jedoch nicht-signifikante Veränderungen der ZSF zu erkennen sind. Eine Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. ($n=4$, Mann-Whitney-U-Test)

Aus Versuchen, in denen der Chlorid-Bikarbonat-Austauscher mittels DiDs blockiert wurde, resultierten passagere nicht-signifikante Änderungen der ZSF von 17,79 \pm 1,53 Hz (T60) über 15,21 \pm 1,30 Hz (T75) auf 13,80 \pm 1,16 Hz (T90). Zum Zeitpunkt T60 wurde NH_4Cl über die Induktionspumpe appliziert. Die Kontrolle der Vitalität der Trachea mit 100 μM ATP führte zu einer Endfrequenz von 30,89 \pm 0,88 Hz (T100) ($p > 0,05$, T75) ($n=4$, Abb. 3.22).

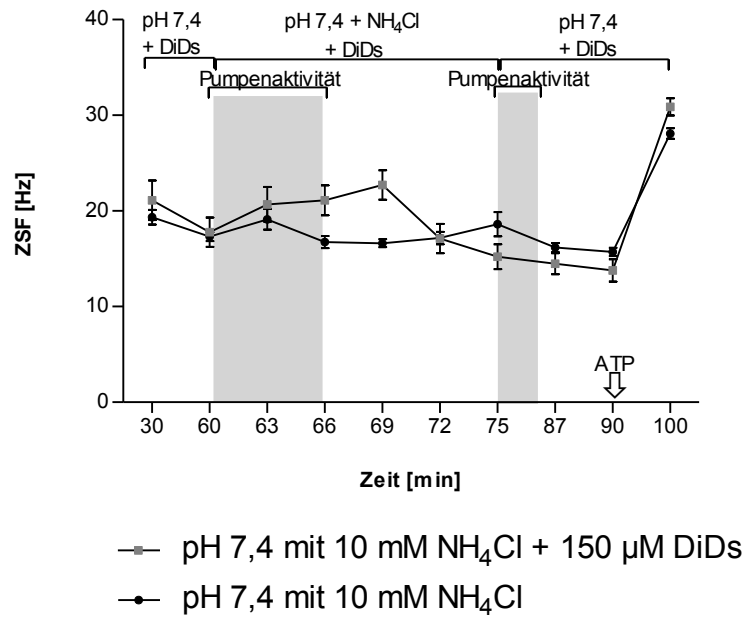


Abb. 3.22 Veränderung der Zilienschlagfrequenz nach Protonenladung und unter Chlorid-Bikarbonat-Austauscher-Inhibition

Dargestellt ist die Auswirkung des Wechsels der HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 auf HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 unter Zusatz von NH_4Cl und die darauf folgende Wiedereinstellung auf HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 unter Verwendung der Induktionspumpe. DiDs war während der gesamten Versuchsdauer in den jeweiligen Puffern vorhanden. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers auf pH 7,4 mit Zusatz von NH_4Cl durchgeführt. Es kam zu keinen signifikanten Veränderungen. Es erfolgte der erneuten Wechsel des Puffers auf pH 7,4 zu den Zeitpunkten T75, T78, T81 (grauer Balken). Die Schlagfrequenz sank weiter ab. Eine Vitalitätskontrolle mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. (n=4, Mann-Whitney-U-Test)

Bei den Versuchen, in denen Amilorid, zur ENaC-Hemmung und DiDs zur Chlorid-Bikarbonat-Austauscher-Hemmung, in Kombination verwendet wurden, veränderte sich die ZSF von $18,70 \pm 0,83$ Hz (T60) auf $21,14 \pm 0,7$ Hz (T69). Die Frequenz sank über $19,81 \pm 0,79$ Hz (T75) auf $18,69 \pm 0,88$ Hz (T90) ab. Zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 erfolgte die pumpengesteuerte Zugabe von NH_4Cl . Es gab hierbei keine signifikanten Veränderungen. Ebenso gab es nach dem Wechsel der Pufferlösung auf pH-Wert 7,4 ohne NH_4Cl keine Veränderungen. Die Kontrolle der Vitalität der Trachea mit $100 \mu\text{M}$ ATP führte zu einer endgültigen Frequenz von $29,82 \pm 0,79$ Hz (T100) ($p > 0,05$, T75) (n=4, Abb. 3.23).

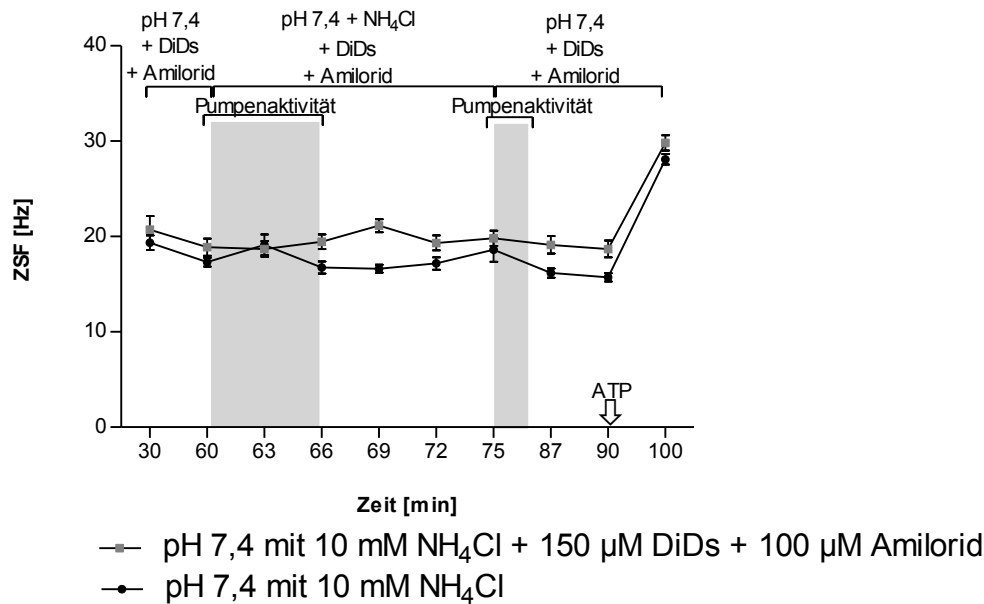


Abb. 3.23 Veränderung der Zilienschlagfrequenz nach Protonenladung und unter Natrium-Kanal- und Chlorid-Bikarbonat-Austauscher-Inhibition

Dargestellt ist die Auswirkung des Wechsels der HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 auf HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 unter Zusatz von NH_4Cl und die darauf folgende Wiedereinstellung auf HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 unter Verwendung der Induktionspumpe. DiDs und Amilorid waren während der gesamten Versuchsdauer in den jeweiligen Pufferlösungen vorhanden. Nach Ablauf der initialen Erholungsphase wurde zu den Zeitpunkten T60, T63 und T66 (grauer Balken) ein Wechsel des Puffers auf pH 7,4 mit Zusatz von NH_4Cl durchgeführt. Es kam zu keinen signifikanten Veränderungen. Der Puffer wurde erneut auf pH 7,4 zu den Zeitpunkten T75, T78, T81 (grauer Balken) gewechselt. Die Kontrollversuche wiesen den gleichen Aufbau auf mit dem Unterschied, dass ausschließlich HEPES-Ringer-Lösung pH 7,4 bei allen Pufferwechseln verwendet wurde. Eine Kontrolle der Vitalität mit ATP erfolgte zum Zeitpunkt T90. (n=4, Mann-Whitney-U-Test)

4 Diskussion

4.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Zilienschlagfrequenz und die Partikeltransportgeschwindigkeit des respiratorischen Epithels der Trachea von Mäusen

Durch die hier vorliegende Arbeit konnten die Effekte von pH-Wertveränderungen auf die PTG und die ZSF in Tracheen von Mäusen gezeigt werden. Während im sauren Bereich bei pH-Wert 5,0 sowohl die PTG als auch die Frequenz des Zilienschlags um nahezu die Hälfte reduziert wurden, so war im basischen Bereich bei pH-Wert 8,0 ein gegenteiliger Effekt mit einer Verdopplung von Frequenz und Geschwindigkeit erkennbar. Die Reversibilität der Effekte im Sinne eines Rückgangs bzw. Anstiegs der PTG und der ZSF wurden ebenfalls gemessen. Resultate im basischen Bereich mit einer vergleichbaren Tendenz, bezogen auf die erhöhte ZSF bei kultivierten, menschlichen Trachealzellen [99], konnten durch Zugabe von NH_4Cl in HEPES-Ringer-Lösung mit pH 7,4 nicht demonstriert werden. Durch die Applikation von NH_4Cl erfolgte die Ladung der Zellen mit Protonen. Die Blockade der entsprechenden Chlorid-Bikarbonat-Kanäle mit DiDs (150 μM) führte dabei zu keiner Veränderung der ZSF. Eine direkte Reduktion der PTG im aziden Bereich pH 5,0 konnte durch das Hinzufügen von Amilorid (100 μM), der ENaC-Inhibition, zwar nicht dargestellt werden. Die PTG wurde durch Amilorid aber dahingehend beeinflusst, dass es bei Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes zu einer langsameren Erholung der Geschwindigkeit kam. Bei der Anwesenheit von Amilorid (100 μM) zeigte sich bei der vitalitätsprüfenden Stimulation mit ATP eine abgeschwächte Wirkung auf dessen geschwindigkeitssteigernden Effekt mit signifikant schwächerem Anstieg der Schlagfrequenz und Transportgeschwindigkeit im Vergleich zu den Kontrollen.

4.2 pH-Wert beeinflussende Untersuchungen an intakten Trachealepithelien

Es existieren nur wenige Informationen zum Einfluss des pH-Wertes auf ZSF und PTG des zilientragenden Epithels der unteren Atemwege. Dabei wurde der Fokus bei diesen Studien meistens auf den extrazellulären pH-Wert gelegt [94], [98], [107].

Damit verbundene Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes können häufig, wie auch in der hier vorliegenden Arbeit, nur vermutet werden.

Die bisherigen Studien lieferten vergleichbare Ergebnisse, in denen gezeigt werden konnte, dass es bei Verwendung von alkalischen Lösungen zu einer Zunahme der Frequenz des Zilienschlages in den Luftwegen von Säugetieren kam, wohingegen die Exposition der Zellen gegenüber sauren Lösungen im Extrazellulärraum zu einer Verminderung der Schlagfrequenz führte [94], [98], [124]. In einer Publikation von Clary-Meinesz et al. von 1998 zu den Auswirkungen des extrazellulären pH-Wertes auf die ZSF (in vitro) in Bronchen und Bronchiolen wurde die Schlagfrequenz an tumorfreien Lungenresektaten des Menschen untersucht [98]. Die Auswahlkriterien wurden dabei sehr großzügig gewählt, da Geschlecht, Alter, Raucheranamnese und Lungenfunktion jeweils keine signifikanten Auswirkungen auf die ZSF hatten [94], [97]. Die infrage kommenden Lungen wurden innerhalb einer Stunde nach Resektion untersucht und geeignete Proben entnommen. Das gewünschte Material wurde bis zu den Messungen für 24 Stunden bei 4°C gelagert. An geeigneten Proben wurden bei Raumtemperatur von 22°C die Versuche durchgeführt. Unter 40facher Vergrößerung wurden die Zellen untersucht. Von Kienast et al. aus den Jahren 1994 und 1996 konnten Ergebnisse zum Verhalten der ZSF in aziden pH-Bereichen bei Zufuhr von Schwefeldioxid (SO₂) geliefert werden [32], [117]. Die zilientragenden Zellen wurden den männlichen und weiblichen Probanden aus dem Oberflächenepithel der hinteren Zweidrittel der Nase unter Zuhilfenahme einer Bürste entnommen. Vor der Zellgewinnung waren die Probanden einer Temperatur von 30°C ausgesetzt. Das gewonnene Material, bestehend aus zilientragenden Zellen und Mukus, wurde für 30 Minuten in eine Ringerlösung mit pH-Wert 7,4 bei 37°C gegeben. Die Zellen wurden nach anschließender Vorbereitung auf Kulturplatten in eine Versuchskammer gebracht, in der eine 37°C warme Atmosphäre herrschte. Verschiedene pH-Werte wurden durch unterschiedliche SO₂-Konzentrationen in der Atmosphäre der Kammer erreicht. Die Ergebnisse zum Verhalten der Zilien in aziden Lösungen lassen sich mit den erhobenen Daten der hier vorliegenden Arbeit vergleichen, da es bei basischen pH-Werten zu einer Zunahme, bei aziden zu einer Abnahme der Frequenz kommt. Ergebnisse, die die Auswirkungen intrazellulärer pH-Wertveränderungen und den Einfluss auf die ZSF der zilientragenden Zellen der Lunge darstellten, wurden von Sutto et al. 2004 publiziert [99]. Die verwendeten Zellen stammten von für

Organtransplantation vorgesehen Lungen, welche aber nicht zur Verpflanzung geeignet waren und abgelehnt wurden. Die Messungen wurden innerhalb einer Zeitspanne von 6 Tagen durchgeführt. Die Zellen befanden sich währenddessen in angelegten Kulturen [118] oder air-liquid-interface (ALI) Kulturen [119], [120], [121]. Damit verschiedene pH-Werte eingestellt werden konnten, wurden drei unterschiedliche Methoden zur Manipulation des intrazellulären pH-Wertes benutzt: Ammonium Pre-Pulse, Entfernung von Kohlendioxid aus der extrazellulären Pufferlösung, Beeinflussung der Permeabilität der basolateralen Membran durch ein poren-erzeugendes alpha-Toxin von *Staphylococcus aureus*. Vergleiche zur vorliegenden Arbeit finden sich bei der verwendeten Ammonium Pre-Pulse-Technik, welche durch den Kontakt der Zelle mit NH_4Cl zu einer Ladung der Zelle mit Protonen führt. Dabei kommt es in der hier vorgestellten Arbeit nach Stimulation mit NH_4Cl zu keiner signifikanten Veränderung der Frequenz. In all diesen Publikationen wurden die Effekte unterschiedlicher pH-Werte an kultivierten Zellen untersucht. In der hier vorgestellten Arbeit wurden diese Auswirkungen an isolierten Tracheen von Mäusen analysiert. Bei Untersuchungen an Zellkulturen lassen sich, im Vergleich zur Untersuchung eines Organs als Ganzes im Zellverbund, Funktionsveränderungen der Zellen und Veränderungen der Organfunktion mitunter nur eingeschränkt beurteilen. Die unterschiedlichen natürlichen Zellkontakte werden bei Verwendung einer isolierten Trachea für die Versuche nicht zerstört. Gap Junctions verbinden dabei das Zytoplasma zweier benachbarter Zellen miteinander und erlauben so den Austausch von Ionen wie K^+ und Ca^{2+} , von Second Messengern wie cAMP, cGMP und IP_3 und kleinen Metaboliten wie Glukose. Dadurch wird die elektrische und biochemische Kopplung der Zellen ermöglicht [108], [109]. Veränderungen des pH-Wertes in azide Bereiche und erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen, die im Rahmen einer Ischämie auftreten können, beeinflussen diese Zell-Zell-Kommunikation bei einer Vielzahl von Zelltypen wie beispielsweise Kardiomyozyten [110], [111]. Die inhibitorische Wirkung eines erhöhten Ca^{2+} -Spiegels auf junctionale Bindungen in Kardiomyozyten kommt dabei womöglich durch Calmodulin zustande [112]. Der Effekt der intrazellulären Azidifikation variiert dabei in Abhängigkeit der die Gap Junctions bildenden Connexine (Cx). Unter den 3 bei Herzzellen vorkommenden Connexinen Cxs, Cx45, Cx40 zeigten diese die höchste und niedrigste Sensitivität auf pH-Wertveränderungen, wobei Cx43

dazwischen lag [113]. Bezogen auf zilientragende Gewebe zeigte sich, dass die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions Ca^{2+} , bei Stimulation der jeweiligen Zelle, in Form einer Welle transportierten. Dadurch erhöhte sich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und somit die ZSF [114]. Durch intrazelluläre Azidifikation konnte dieser wellenförmige Transport in *Obelia* Photozyten [115] und zwischen Follikelzellen und Oozyten [116] gehemmt werden. Bezogen auf das respiratorische Epithel lässt sich vor dem Hintergrund der vorgestellten Ergebnisse vermuten, dass auch hier die Gap Junctions durch azide pH-Werte beeinflusst werden könnten und somit der Zell-Zell-Austausch gemindert wird. Bezogen darauf lässt sich zusätzlich vermuten, dass die Reduktion dieser Transportvorgänge folgendermaßen nicht nur zu einer Abschwächung des Ca^{2+} -Einstroms führt, sondern auch zu einer Veränderung des K^{+} -Transports und dadurch weiteren Einfluss auf die Homöostase und die pH-Regulation der Zelle nehmen kann. Allerdings werden bei der Untersuchung eines Organs als Ganzes im Zellverbund alle Zellen dem jeweiligen pH-Wert ausgesetzt. Somit erfahren nicht nur einzelne Zelltypen, wie beispielsweise die Trachealepithelzellen, eine Veränderung ihres Milieus, sondern alle das Organ betreffende Zellen. Über Gap Junctions werden folglich die Informationen weiter getragen und die übrigen Zellen beeinflusst. Zusätzlich wurden in der hier vorliegenden Arbeit erste Messungen 30 Minuten nach Entnahme der Organe durchgeführt. Es ist anzunehmen, dass durch die zeitnahe Bearbeitung der entnommenen und entsprechend präparierten Trachea mit anschließender in vitro Mikroskopie Bedingungen aufrechterhalten werden können, die in vivo Bedingungen nahezu entsprechen. Es ist zu vermuten, dass neben der Funktion der intraflagellaren Transportproteine (IFT), dessen Aufgaben neben der Aufrechterhaltung der Zilien, die Ziliogenese und die Signaltransduktion der Zilien untereinander beinhalten [117], auch die generelle Zilienfunktion durch verlängerte Zeiträume von Organentnahme bis zum Beginn der Versuchsdurchführung beeinflusst werden können. In den bereits erwähnten Studien wurden die Versuche teilweise erst nach 6 Tagen durchgeführt [99]. Die Mechanosensitivität spielt eine Rolle bei der Regulation der ZSF, da durch Scherkräfte die ZSF deutlich erhöht werden kann. Eine Reduktion dieser Scherkräfte führt dabei zu einer Abnahme der ZSF. Die ZSF-Reaktion ist dabei fein auf Scherkräfte abgestimmt und wahrscheinlich abhängig von extrazellulärem Ca^{2+} , sowie auch von ATP und damit verbundener scherkraftabhängiger P2Y2 und

Adenosin-Rezeptor-Aktivierungen [118]. Die Verwendung der Micro-Perfusions-Pumpe, die zum Wechsel der Pufferlösungen für die präparierten Tracheen diente, hatte durch die „Low-Flow“-Einstellung, welche 75 ml Flüssigkeit pro Stunde förderte, keine Auswirkungen auf die PTG oder ZSF. Es kam folglich zu keinen durch Scherkräfte oder Verwirbelungen hervorgerufenen signifikanten Frequenz- oder Geschwindigkeitsschwankungen. Die Ergebnisse korrelierten beim Vergleich miteinander. Die für den Transport der jeweiligen Pufferlösung verwendeten Leitungen wurden ausreichend isoliert, um eine Flüssigkeitstemperatur von 30°C in der Kulturschale aufrechtzuerhalten. Bei der Versuchsdurchführung kam der Konstanthaltung der Temperatur eine immense Wichtigkeit zu, da die ZSF temperaturabhängig ist [2]. Messungen bei Ratten ergaben bei einer Temperatur von 25°C eine Frequenz von 10,9 Hz, bei einer Temperaturerhöhung auf 35°C stieg die Schlagfrequenz auf 19,8 Hz an [2]. Durch die Untersuchung von PTG und ZSF unter gleichen Versuchsbedingungen lassen sich Vermutungen über eventuelle Veränderungen der mukoziliären Clearance aufstellen. Dabei lässt sich annehmen, dass eine Zunahme der ZSF auch einen schnelleren Transport der Partikel bedeutet und somit die PTG ansteigt. Der gegenteilige Effekt ist bei einer Abnahme der ZSF mit dementsprechend sinkender PTG zu vermuten. Die in der hier vorliegenden Arbeit durch die unterschiedlichen pH-Werte hervorgerufenen Effekte auf die ZSF korrelierten mit der PTG. Eine gemessene Zu- bzw. Abnahme der ZSF durch basische bzw. azide pH-Wertveränderungen lässt somit vermuten, dass die Bewegungsabläufe der Zilien langsamer, aber nach wie vor koordiniert ablaufen und eine schnellere oder langsamere PTG daraus resultiert. Veränderungen der PTG und ZSF konnten auch bei der Stimulation von Acetylcholin, Platelet-Activating Factor (PAF), A.suum (bei Schafen mit *Ascaris suum* Hypersensitivität) und Epinephrin beobachtet werden. Inwiefern eine Veränderung der ZSF auch Einfluss auf die mukoziliäre Clearance hatte, wurde von Seybold et al. 1990 beschrieben [119]. Hierzu wurden Teile von frisch entnommenen Tracheen von erwachsenen Schafen verwendet. Diese wurden auf einem Plexiglasblock in einer Versuchskammer montiert, die die Möglichkeit zur Perfusion bot. Dabei wurde die Trachea, mit der Mukosaseite nach oben gerichtet, über einem Loch in dem Block positioniert. Über eine Wanne an der Unterseite der Kammer konnte überschüssige, sich ansammelnde Oberflächenflüssigkeit gesammelt werden. Die Kammer wurde von einem Zelt

umgeben, um eine Temperatur von 39°C aufrechterhalten zu können. Neben der ZSF wurden bei dieser Art von Versuchen noch die Tiefe und die Geschwindigkeit der oberflächlichen Flüssigkeit gemessen. Aufgrund dessen konnten auch Rückschlüsse gezogen werden, inwiefern eine Zu- oder Abnahme der Frequenz auch einen Effekt auf die mukoziliäre Clearance hatte. Die von Seybold verwendete Methode zur Untersuchung der mukoziliären Clearance, welche neben der ZSF auf der Messung der Tiefe und die Beschleunigung der oberflächlichen Flüssigkeit basierte, kann mit der Messung der PTG unter Zuhilfenahme von Dynabeads verglichen werden. Die in der hier vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Ermittlung der PTG mit Dynabeads wirkt dabei aufgrund der genaueren mengenmäßigen Applizierbarkeit allerdings besser reproduzierbar als die beschriebene Messung der sich ansammelnden Oberflächenflüssigkeit. Im Einzelnen zeigte sich bei der Betrachtung der Ergebnisse, dass es bei Zugabe von Acetylcholin und PAF sowohl zu einer Zunahme der ZSF als auch zu einer Zunahme der Geschwindigkeit der oberflächlichen Flüssigkeit kam. Die Korrelation von ZSF und Beschleunigung der oberflächlichen Flüssigkeit ist dabei vergleichbar mit den in der vorliegenden Arbeit korrelierenden Ergebnissen in Bezug auf PTG und ZSF bei unterschiedlichen pH-Werten. Epinephrin hingegen erhöhte die ZSF, ohne dabei die Geschwindigkeit zu erhöhen. In einer zurzeit nur in Form eines Abstracts publizierten Arbeit aus der gleichen Arbeitsgruppe wie die der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass die Applikation von Epinephrin zu einer Zunahme von ZSF und PTG führt [148]. Bei der Bearbeitung mit A.suum erhöhte sich die Schlagfrequenz, während die Geschwindigkeit der oberflächlichen Flüssigkeit reduziert wurde.

4.3 Effekte von pH-Wertveränderungen auf Partikeltransportgeschwindigkeit und Zilienschlagfrequenz

Während sich bei Clary-Meinesz [98] die ZSF der Bronchialzellen in den pH-Bereichen von 7,5–10,5 nicht veränderte, ließen sich in der hier vorgestellten Arbeit bereits deutliche Veränderungen bei einem pH-Wert von 8,0 im Sinne einer Verdopplung der Schlagfrequenz darstellen. Diese Unterschiede lassen sich anhand der verschiedenen Komponenten des Versuchsaufbaus erklären. Neben der Tatsache, dass die Versuche an kultivierten menschlichen Zellen durchgeführt wurden, wurden

dabei insbesondere Zellen des respiratorischen Epithels von Bronchien und Bronchiolen untersucht, während in der hier vorliegenden Arbeit die Versuche an Tracheen von Mäusen durchgeführt wurden. Darüber hinaus wurden die Versuche auch bei einer deutlich geringeren Versuchstemperatur von 22°C durchgeführt, wohingegen die Tracheen der Mäuse bei 30°C untersucht wurden. Eine Reduktion der Frequenz zeichnete sich bei pH-Wert 7,0 ab, während es bei Versuchen mit dem gleichen pH-Wert in der hier vorliegenden Arbeit nicht zu signifikanten Veränderungen kam. Bei Erreichen von pH-Wert 5,5 war die ZSF bereits um 50% reduziert. Diese Ergebnisse decken sich nahezu mit den hier dargestellten Daten bei pH 5,0. Bei den Versuchen von Clary-Meinesz stellte sich ein Stopp der Zilienbewegung bei pH 3,5 ein. Bei den pH-Werten 3,0 und 11,0 waren die Zellen unwiderruflich geschädigt. Diese extremen pH-Werte wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Bei Betrachtung der ZSF der Bronchiolen zeigte sich ein ähnliches Ergebnis mit der Ausnahme, dass sich keine signifikanten Unterschiede bei den pH-Werten 7,0 und 7,5 fanden. Die 50%ige Frequenzreduktion wurde auch bei pH 5,5 erfasst, genauso wie die Schädigung der Zellen bei pH 3 und 11.

Die Ergebnisse zur Beeinflussung der ZSF von Kienast et al [32], [107], die durch die Applikation von Schwefeldioxid (SO₂) und den daraus resultierenden extrazellulären pH-Werten entstanden, zeigten vergleichbare Ergebnisse mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen. Je höher die SO₂-Konzentration in der Atmosphäre der Versuchskammer gewählt wurde, desto niedriger wurde der pH-Wert und umso stärker sank auch hier die Schlagfrequenz ab. Der pH wurde dabei bis auf 3,6 abgesenkt. Bei Wiederherstellung der ursprünglichen Atmosphäre in der Versuchskammer zeigte sich eine Erholung der Schlagfrequenz. Die Reversibilität der Effekte durch Veränderungen der pH-Werte ins azide oder basische konnten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls demonstriert werden.

Auch die von Sutto et al. [99] publizierten Ergebnisse aus dem Jahr 2004 demonstrierten den Einfluss des pH-Wertes auf die mit Zilien besetzten Zellen der Trachea des Menschen in Zellkulturen. Durch Methoden wie die Ammonium Pre-Pulse Technik war es möglich, den intrazellulären pH-Wert der Zellen zu verändern, ohne jedoch den pH-Wert der umgebenden Lösung zu beeinflussen. Beim Austausch des ammoniumfreien HEPES-Puffers gegen HEPES-Puffer-Lösung, bei der 10 mM

NaCl durch 10 mM NH_4Cl ersetzt wurden, konnte ein Anstieg des intrazellulären pH-Wertes und ZSF registriert werden. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigten keine frequenzsteigernde Wirkung beim Einsatz von NH_4Cl . Die Blockade der Chlorid-Bikarbonat-Austauscher führt dazu, dass Chlorid aus der Zelle gepumpt, Bikarbonat in der Zelle verbleibt und so die Zelle alkalisiert wird. Bikarbonat fungiert dabei als Base. Die Alkalisierung der Zelle führt vermutlich auch über Bikarbonat zu einer Veränderung der Pufferkapazität. Sutto et al. zeigten zusätzlich, dass es nach Wiederherstellung der HEPES-Lösung und Entfernung des extrazellulären NH_4^+ zu einer Azidifikation der Zelle kam, was einen Abfall von der Schlagfrequenz und des pH-Wertes mit sich brachte. Die andere Methode mit der der intrazelluläre pH-Wert, ohne den des Puffers zu verändern, beeinflusst wurde und somit eine Wirkung auf die Schlagfrequenz der Zilien hatte, war die Entfernung von Kohlendioxid aus dem Extrazellulärraum [120], [121], [122]. Dafür wurden Zellen in einer geschlossenen Kammer kontinuierlich mit $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Lösung perfundiert. Der intrazelluläre Ausgangs-pH-Wert war niedriger als bei den Zellen, die mit $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -freier HEPES-Lösung behandelt wurden. Vergleichend dazu war auch die zu Beginn gemessene ZSF in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Lösung deutlich erniedrigt. Bei einem Wechsel der $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferten Lösung auf $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -freien Puffer mit gleichem pH-Wert konnte ein schneller Anstieg des intrazellulären pH-Wertes registriert werden. Bikarbonat fungiert dann als starke Base und führt darüber zu einer Alkalisierung. Bei Wiedereinstellung der Ausgangslösung und dem Einstrom von extrazellulärem CO_2 , welches intrazellulär in Carbonsäure umgewandelt wurde, konnte ein Abfall des pH-Wertes unter den Ausgangs-pH-Wert gemessen werden. Diesem schloss sich ein leichter Anstieg des intrazellulären pH-Wertes an. Ähnlich wie bei den Ammonium-Pre-Pulse-Versuchen folgte die ZSF dem sich wechselnden intrazellulären pH-Wert. Obwohl die Entfernung des externen CO_2 zu höheren Anstiegen von ZSF und intrazellulärem pH-Wert führten als bei der Ammonium-Pre-Pulse-Methode, so verhielten sich diese beiden Parameter im Verhältnis zueinander bei Betrachtung der beiden verwendeten Methoden nicht unterschiedlich. Durch unterschiedliche pH-Werte wird des Weiteren vermutlich auch der cAMP- und cGMP-Transport beeinflusst, welcher ebenfalls die ZSF mitbestimmt [123], [124], [125]. Änderungen des pH-Wertes haben dabei keinen direkten Einfluss auf die Aktivität von cAMP, führen aber über die Stimulation der

Adenylatcyclase bei azidem pH zu einer vermehrten, bei basischem pH zu einer reduzierten cAMP-Produktion. Ein niedriger pH und die daraus resultierende reduzierte ZSF werden somit über eine vermehrte cAMP-Ausschüttung dahingehend beeinflusst, dass die ZSF wieder ansteigt [126]. Allerdings spielt cAMP selbst eine Rolle in der Regulation des pH-Wertes. Bei Osteoblasten erfolgt die Regulation über Beeinflussung der Aktivität von Na^+/H^+ -Austauschern und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschern [127]. Ob cAMP eine ähnliche Rolle bei der Regulation des pH-Wertes spielt, indem es die Aktivität Na^+/H^+ -Austauschern und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschern bei Zellen des unteren Atemtraktes verändert, ist nicht bekannt. Der Na^+/H^+ -Austauscher ist für die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes von großer Bedeutung. Die Na^+/H^+ -Austauschrate ist dabei stark von dem intrazellulären pH-Wert abhängig [43]. Zusätzlich wird der Na^+/H^+ -Antiporter von ATP [128] und Amilorid [129] beeinflusst. Vor diesem Hintergrund lässt sich vermuten, dass das verzögerte Erreichen der Endgeschwindigkeit bei Wiedereinstellung des physiologischen pH-Wertes bei Applikation von Amilorid mit dem so inhibierten Na^+/H^+ -Austauscher zusammenhängt. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die, zwar nicht signifikant, niedrigere Stimulierbarkeit des respiratorischen Epithels durch ATP, ebenfalls durch die mittels Amilorid inhibierten Na^+/H^+ -Austauscher zustande kommt. In neueren Studien konnte ein Na^+/H^+ -Austauscher in den Mitochondrien von Herzzellen identifiziert werden [130]. Der unter physiologischen Bedingungen eher basische pH-Wert des Mitochondriums wird durch den pH-Wert des Zytosols mitbeeinflusst [131]. Ob Amilorid dabei auch einen hemmenden Effekt auf diesen Austauscher in den Mitochondrien hat, ist zurzeit nicht beschrieben. Da ein azider pH-Wert unter physiologischen Bedingungen im Mitochondrium zu einer vermehrten ATP-Produktion führt [132] und es bei Versuchen mit HEPES-Puffer-Lösungen mit aziden pH-Werten von 5,0 und 6,0 zu keinen Unterschieden der PTG bei der Vitalitätskontrolle mit ATP kam, lässt sich die Rolle von Amilorid für eingeschränkte Stimulierbarkeit nicht ausschließen. Amilorid führt durch die Inhibition des epithelialen Natriumkanal (ENaC) zu einer intrazellulären Azidifikation, da es als Hemmstoff des Na^+/H^+ -Austausches fungiert [133]. In der hier vorliegenden Arbeit ließ sich ein direkt die PTG reduzierender Effekt von Amilorid nicht darstellen. Es wird vermutet, dass der intrazelluläre pH-Wert seinen Einfluss auf die Motilität der zilientragenden Zellen direkt an der Mechanik dieser

Zellen hat, wahrscheinlich am äußeren Dyneinarm [99]. Dabei bleibt der genaue Mechanismus allerdings ungeklärt. Eine Vermutung, die sich nicht mit Literatur belegen ließ, wäre eine Veränderung der Ladung von Histidin und damit einer möglichen Beeinflussung der Dynein-ATPase oder einer leichten Dyneinkette, die die Dynein-ATPase Aktivität beeinflussen würde. Eine Konformationsänderung an der leichten Dyneinkette wurde auf eine pH-induzierte Änderung der Histidin Ionisation zurückgeführt [134]. Diese leichte Dyneinkette, die auch LC8 genannt wird, wurde ursprünglich am äußeren Dyneinarm gefunden [135]. So wurde beschrieben, dass LC8 eine wichtige Rolle für den Schlag von Flagellen spielte und je nach Abhängigkeit der Histidin Ionisation als Dimer oder Monomer vorlag [134]. Weitere Studien, die einen direkten Einfluss von sich ändernden pH-Werten auf die ZSF beschrieben, untersuchten dabei Spermatozoen, von welchen die sie umgebenden Membran entfernt wurde, von Säugetieren. Neben der Tatsache, dass sich die Flagellen des Spermiums vom ultrastrukturellen Aufbau dem der Zilien ähnelten, gab es auch Gemeinsamkeiten bei der Regulation der Schläge [136]. In den meisten Arbeiten wurde eine Zunahme der Schlagfrequenz der Flagellen unter leicht alkalischen Bedingungen bei verschiedenen Spezies beschrieben [137], [138], [139]. In der Studie von Keskes et al. 1998 konnte demonstriert werden, dass es bei menschlichen Spermatozoen, denen ein äußerer Dyneinarm fehlte, bei alkalischen pH-Werten nicht zu einem Anstieg der ZSF kam [139], wobei der äußere Arm maßgeblich an der pH-abhängigen Regulation beteiligt sein könnte [138]. Ob die Effekte des pH-Wertes allein durch diese Mechanismen zustande kamen blieb unklar, da einige Effekte in den Spermatozoen auch durch eine pH-bedingte Stimulation der löslichen Adenylatcyclase zustande kommen könnten, welche unentbehrlich für die Funktion der Spermatozoen war [140].

An permeabilisierten Zellen der menschlichen Trachea konnte des Weiteren demonstriert werden, dass die Konzentration von NH_4^+ und/oder NH_3 direkt keinen Einfluss auf die ZSF hatte, sondern dass die Effekte durch die Veränderung des intrazellulären pH-Wertes bewirkt wurden [99].

Beim abschließenden Vergleich der hier vorliegenden Arbeit mit verschiedenen Studien [94], [98], [99], [107], welche mit unterschiedlichen Methoden eine extra- oder intrazelluläre pH-Wertänderung herbeigeführt haben, lässt sich neben der Tatsache,

dass die hervorgerufenen Effekte bei nicht zu stark ins saure oder basische abweichende reversibel sind, auch festhalten, dass von einer direkten pH-induzierten Wirkung auf die ZSF und PTG ausgegangen werden kann.

4.4 Klinischer Bezug

Der extrazelluläre pH-Wert in Blut und Geweben wird in engen Grenzen konstant gehalten, eine Abweichung kann nach kurzer Zeit Organfunktionen verändern. Gerade das Flimmerepithel der Atemwege ist empfindlich gegenüber physiologischen Veränderungen, sein Clearancemechanismus wird unter anderem durch pH-Wertverschiebungen beeinträchtigt. Häufig werden pH-Wertveränderungen unterschiedlicher Genese bei Intensivpatienten beobachtet, die ein erhöhtes Risiko für eine Pneumonie haben. Besonders gefährdet sind dabei Patienten mit einer metabolisch sauren Stoffwechsellage. Darunter fallen unter anderem Patienten mit ausgeprägten Verbrennungen [141], Patienten mit schwerem Trauma und damit einhergehender Rhabdomyolyse [142], parenteral ernährte Patienten [143], cardiopulmonal reanimierte Patienten [144], niereninsuffiziente Patienten [145] und septische Patienten [146]. Der sauren Stoffwechsellage bei Patienten mit Verbrennungen sowie traumatisierten Patienten liegen drei eng miteinander verknüpfte Stoffwechselwege zugrunde. Beschädigte Zellen schütten ihr kaliumreiches Zytosol in das umgebende Gewebe aus. Über die durch Entzündungsprozesse erhöhte kapilläre Permeabilität erfolgt der Kaliumtransport nach intravsal. Über die große Masse an zerstörtem Gewebe wird zusätzlich Harnsäure, Myoglobin, Proteine und Metabolite des Proteinstoffwechsels in die Blutbahn ausgeschüttet. Die daraus resultierende metabolische Azidose veranlasst nicht beschädigte Zellen dazu K^+ - gegen H^+ -Ionen auszutauschen, in einem Versuch das Ungleichgewicht des pH-Wertes zu normalisieren. Diese metabolisch saure Stoffwechsellage in Kombination mit übermäßig anfallendem Myoglobin aus geschädigten Muskelzellen kann zu einem akuten Nierenversagen führen, welches wiederum zu einer verringerten Kaliumexkretion und erhöhtem Anfall von Laktat führt. Auch im Rahmen der cardiopulmonalen Reanimation kann je nach Ursache des Kreislaufstillstandes die Azidose eine entscheidende Rolle einnehmen, da Hypoxie durch anaerobe Stoffwechselwege zur Azidose führen kann. Unter

permissiver Hyperkapnie (PHC) wird eine tolerable Hyperkapnie mit respiratorischer Azidose verstanden, welche bei der protektiven Beatmung mit niedrigen Tidalvolumina und geringen Druckamplituden häufig auftritt. Ein Ungleichgewicht im Säure-Basen Haushalt hat sowohl Auswirkungen auf die PTG als auch auf die ZSF. Während ein erhöhter pH-Wert eine Zunahme von PTG und ZSF zur Folge hat, führt ein erniedrigter pH-Wert zu deren Abnahme. Damit einhergehend wird die mukoziliäre Clearance negativ beeinflusst. Für Risikopatienten, wie Intensivpatienten, die aufgrund unterschiedlicher Krankheitsbilder eine metabolische Azidose aufweisen, besteht somit ein erhöhtes Risiko durch Reduktion der Reinigungsfunktion der unteren Atemwege, bei gleichzeitiger Aufhebung des Hustenreflexes, eine Ventilator-assoziierte Pneumonie (VAP) zu entwickeln [147]. In Verbindung mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit lässt sich festhalten, dass eine Dysregulation des Säure-Basenhaushaltes zeitnah ausgeglichen werden sollte, da es bei Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes auch zu einer Normalisierung von PTG und ZSF kommt. Es lässt sich somit vermuten, dass einer physiologischen Stoffwechsellage ebenfalls eine hohe Bedeutung bei der Prophylaxe der VAP zukommt.

4.5 Ausblick

Unter Benutzung des hier beschriebenen Versuchsaufbaus wäre es von großem Interesse zu erforschen, ob vergleichbare Ergebnisse bei der pH-Wertveränderung durch Veränderungen der CO₂-Konzentration resultieren würden. In Verbindung damit wäre eine Untersuchung der pH-Wertregulation, und inwiefern die Adenylatcyclase als CO₂-Sensor dient, interessant. Hierzu müsste der bestehende Versuchsaufbau um eine Kammer zur Begasung der die Trachea enthaltende Kulturschale erweitert werden. Des Weiteren wäre es interessant herauszufinden, ob die Beeinflussung des pH-Wertes mit Laktat vergleichbare Ergebnisse liefern würde, da es im Rahmen der Sepsis zu einem starken Laktatanstieg und daraus resultierender Azidose kommen kann. Unter diesem Gesichtspunkt wären auch Versuche im sauren pH-Spektrum mit Acetoacetat, Aceton und β -Hydroxybutyrat oder ähnlichen Stoffen denkbar, die eine katabole Stoffwechsellage mit Anfall von Ketonkörpern simulieren könnten. Bei einer Sepsis werden auch die Mitochondrien, die dort stattfindende Atmungskette und damit die ATP-Synthese beeinflusst.

Hieraus kann ein Ungleichgewicht aus Acetoacetat, Aceton und β -Hydroxybutyrat resultieren.

5 Zusammenfassung

Der extrazelluläre pH-Wert beeinflusst direkt die reinigende Funktion des Flimmerepithels der unteren Atemwege. Durch die mukoziliäre Clearance wird der Organismus vor pathogenen Keimen und Noxen geschützt. Pathophysiologische Prozesse können zu einem Ungleichgewicht des Säure-Basen-Haushaltes führen, was die Funktion des trachealen Flimmerepithels beeinflusst. Die vorliegende Arbeit untersuchte mit In-Vitro-Mikroskopie, inwiefern saure bzw. basische pH-Werte einen Einfluss auf den ziliären Transport in der Trachea der Maus haben. Die Veränderungen der pH-Werte wurden durch Austausch der jeweiligen Pufferlösungen unter Zuhilfenahme einer Micro-Perfusions-Pumpe erreicht. Durch die Pumpe wurden keine auf die Zilien einwirkenden Scherkräfte entwickelt, die die PTG oder ZSF hätten beeinflussen können. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Effekte der pH-Wertänderung reversibel waren. Durch Messung der PTG und der ZSF der Trachea in gepufferten Lösungen konnte gezeigt werden, dass saure pH-Werte im Bereich von 5,0 und 6,0 einen negativen Effekt, im Sinne einer Verlangsamung, auf die PTG und die ZSF hatten. Vergleichend dazu konnte im basischen pH-Bereich bei 8,0 eine Zunahme von PTG und ZSF verzeichnet werden. Sowohl die Effekte im sauren als auch im basischen Bereich waren bei Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes reversibel. Durch Blockade des Natrium-Protonen-Austauschers mit Amilorid oder des Chlorid-Bikarbonat-Austauschers durch DiDs wurde die Regulation des intrazellulären pH-Werts über die veränderte Funktion des Flimmerepithels überprüft. Bei Hemmung des Natrium-Protonen-Austauschers kam es beim Wechsel von pH-Wert 5,0 auf 7,4 zu einer Reduktion der Beschleunigung und einer deutlich langsameren Regeneration der PTG. Ein direkt die PTG reduzierender Effekt durch Amilorid konnte nicht dargestellt werden. Bei der Inhibition des Chlorid-Bikarbonat-Austauschers in Kombination mit NH_4Cl in Pufferlösung pH 7,4 konnten keine signifikanten Veränderungen der ZSF registriert werden. Ein Ungleichgewicht im Säure-Basen Haushalt hat sowohl Auswirkungen auf die PTG als auch auf die ZSF. Während ein erhöhter pH-Wert eine Zunahme von PTG und ZSF zur Folge hat, führt ein erniedrigter pH-Wert zu deren Abnahme.

6 Summary

The extracellular pH directly affects the cleansing function of the ciliated epithelium of the lower respiratory tract. Against pathogens and toxicants the organism is protected by mucociliary clearance. Pathophysiological processes can lead to an imbalance of acid-base balance, which affects the function of the tracheal epithelium. The present work examined with in vitro microscopy, how acidic or basic pH values have an effect on the ciliary transport in the trachea of the mouse. The changes in the pH values were achieved by exchange of the respective culture media with the aid of a micro perfusion pump. By the pump no shear forces acting on the cilia were developed that could have influenced the particle transport velocity or ciliary beat frequency. Furthermore, it was examined whether the effects of pH change were reversible. By measuring the particle transport velocity and the ciliary beat frequency of the trachea in buffered nutrient solutions, it could be shown that acidic pH values in the range of 5,0 and 6,0 have a negative effect, by showing signs of deceleration on the particle transport speed, as well as on the ciliary beat frequency. For comparison, was recorded in the basic pH range of 8,0, an increase of particle transport rate and ciliary beat frequency. Both effects in the acid, as well as in the basic range were reversible with restoration of the physiological pH. Through blockade of the sodium-proton exchanger with amiloride or the chloride-bicarbonate exchanger by DiDs, the regulation of intracellular pH changes on the function of the ciliated epithelium was reviewed. The inhibition of the sodium-proton exchanger lead to a significantly slower regeneration of the particle transport speed and reduced acceleration during the change from pH 5,0 to 7,4. A direct the PTG reducing effect by amiloride could not be shown. In the inhibition of chloride-bicarbonate exchanger in combination with ammonium chloride in buffered solution with pH 7,4, no significant changes in ciliary beat frequency could be registered. An imbalance in the acid-base balance has an effect on both the particle transport velocity, as well as on the ciliary beat frequency. An increased pH results in an increase of particle transport rate and ciliary beat frequency while a decreased pH is leading to their loss.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Lichtmikroskopisches und elektronenmikroskopisches Bild von Epithelzellen mit periziliärer Flüssigkeit und Mukusschicht.....	2
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Querschnitts eines motilen Ziliums ohne umgebende Plasmamembran.....	5
Abbildung 1.3: pH-Werte unterschiedlicher subzellulärer Kompartimente.....	8
Abbildung 1.4: Zytoplasmatische pH-Regulation über Ionen-Kanäle.....	13
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit.....	24
Abbildung 2.2: Ablauf der Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit	26
Abbildung 2.3: Ablauf der Messung der Zilienschlagfrequenz.....	28
Abbildung 2.4: Vorversuche zum pumpengesteuerten Austausch der Pufferlösungen.....	30
Abbildung 2.5: Aufbau der Versuche mit einfachem Pufferwechsel.....	32
Abbildung 2.6: Aufbau der Versuche mit zweimaligem Pufferwechsel.....	35
Abbildung 2.7: Aufbau der Versuche mit Applikation von Amilorid.....	35
Abbildung 2.8: Aufbau der Versuche mit Applikation von Amilorid und dessen Auswaschung.....	37
Abbildung 2.9: Wirkungen von DiDs und Amilorid auf die Zilienschlagfrequenz bei Anwesenheit von NH_4Cl	37
Abbildung 3.1: Effekt der Pumpe auf die Partikeltransportgeschwindigkeit.....	40
Abbildung 3.2: Effekt der Pumpe auf die Zilienschlagfrequenz.....	41
Abbildung 3.3: Effekte des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Werte 5,0 und dem erneuten Wechsel auf pH-Wert 7,4 auf die Partikeltransportgeschwindigkeit.....	42
Abbildung 3.4: Effekte des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Werte 6,0 und dem erneuten Wechsel auf pH-Wert 7,4 auf die Partikeltransportgeschwindigkeit.....	43

Abbildung 3.5: Effekte des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Werte 7,0 und dem erneuten Wechsel auf pH-Wert 7,4 auf die Partikeltransportgeschwindigkeit.....	44
Abbildung 3.6: Effekte des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Werte 8,0 und dem erneuten Wechsel auf pH-Wert 7,4 auf die Partikeltransportgeschwindigkeit.....	45
Abbildung 3.7: Einfluss des Pufferwechsels auf die Partikeltransportgeschwindigkeit 15 Minuten nach Pufferwechsel...	46
Abbildung 3.8: Effekte des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Werte 5,0 auf die Zilienschlagfrequenz.....	47
Abbildung 3.9: Effekte des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Werte 8,0 auf die Zilienschlagfrequenz.....	48
Abbildung 3.10: Wirkungen des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Werte 6,0 auf die Partikeltransportgeschwindigkeit.....	49
Abbildung 3.11: Wirkungen des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Werte 8,0 auf die Partikeltransportgeschwindigkeit.....	50
Abbildung 3.12: Korrelation zwischen Zilienschlagfrequenz und Partikeltransportgeschwindigkeit für pumpengesteuerten Pufferwechsel bei pH-Wert 7,4.....	51
Abbildung 3.13: Korrelation zwischen Zilienschlagfrequenz und Partikeltransportgeschwindigkeit für pumpengesteuerten Pufferwechsel bei pH-Wert 8,0.....	51
Abbildung 3.14: Korrelation zwischen Zilienschlagfrequenz und Partikeltransportgeschwindigkeit für pumpengesteuerten Pufferwechsel bei pH-Wert 5,0.....	52
Abbildung 3.15: Wirkungen von DiDs auf die Zilienschlagfrequenz.....	53
Abbildung 3.16: Wirkungen von DiDs und Amilorid auf die Zilienschlagfrequenz.....	54

Abbildung 3.17: Wirkungen des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Wert 5,0 mit Amilorid und dem erneuten Wechsel auf pH-Wert 7,4 mit Amilorid.....	55
Abbildung 3.18: Wirkungen des Pufferwechsels von pH-Wert 7,4 auf pH-Wert 5,0 mit Amilorid und dem erneuten Wechsel auf pH-Wert 7,4 mit Amilorid, gefolgt von Pufferwechsel auf pH 7,4.....	57
Abbildung 3.19: Wirkungen von 100 μ M Amilorid auf die Erholung der Partikeltransportgeschwindigkeit.....	58
Abbildung 3.20: Auswirkungen der Natrium-Kanal-Inhibition auf die Beschleunigung der Partikeltransportgeschwindigkeit.....	59
Abbildung 3.21: Wirkungen auf die Zilienschlagfrequenz bei Zusatz von NH_4Cl ...	60
Abbildung 3.22: Wirkungen von DiDs auf die Zilienschlagfrequenz bei Zusatz von NH_4Cl	61
Abbildung 3.23: Wirkungen von DiDs und Amilorid auf die Zilienschlagfrequenz bei Zusatz von NH_4Cl	62

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AE/SLC4A	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -Austauscher
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAPSO	N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl ₂	Chlor
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Cx	Connexine
DiDs	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ENaC	epithelialer Natriumkanal
ER	endoplasmatischen Retikulum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Gauge
H ⁺	Wasserstoff
HCl	Chlorwasserstoff/Salzsäure
HCO ₃ ⁻	Hydrogenkarbonat/Bikarbonat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kiloDalton
M	Molar
M.	Musculus
MCT	Monocarboxylat/H ⁺ -Cotransporter
MD	Meridian
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
min	Minuten
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

mM	Millimolar
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBC	Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ -Cotransporter
NBCe	Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ -Cotransporter (elektrogene Isoform)
NBCn	Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ -Cotransporter (elektroneutralen Isoform)
NDCBE	Na ⁺ -abhängigen Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -Austauscher
ng	Nanogramm
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NHEDC	Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter
NHE/SLC9A	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasen
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Platelet Activating Factor
PHC	Permissive Hyperkapnie
PMCA	Plasmamembranständige Ca ²⁺ -ATPasen
PTG	Partikeltransportgeschwindigkeit
s	Sekunde
S	Schwefel
s.	siehe
SCC	solitäre chemosensorische Zellen
SEM	Standardfehler
SO ₂	Schwefeldioxid
t	Zeit
T	Zeitpunkt
v	Geschwindigkeit
V	Volt
VAP	Ventilator-assoziierte Pneumonie
ZSF	Zilienschlagfrequenz

9 Literaturverzeichnis

- [1] Julius D, Clapham DE. Annual review of physiology: Annual Reviews; 2008.
- [2] Sleigh MA, Blake JR, Liron N. The propulsion of mucus by cilia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988;137:726–41.
- [3] Wanner A, Salathé M, O'Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996;154:1868–902. [Reprinted with permission of the American Thoracic Society. Copyright © 2016 American Thoracic Society]
- [4] Delmotte P1, Sanderson MJ. Ciliary beat frequency is maintained at a maximal rate in the small airways of mouse lung slices; 2006.
- [5] Knowles, M., Boucher, R.C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways: American Society for Clinical Investigation; 2002. doi: [10.1172/JCI15217](https://doi.org/10.1172/JCI15217)
- [6] Sanderson, M.J., Sleigh, M.A. Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: beat pattern and metachrony 1981:331–41. <http://jcs.biologists.org/content/joces/47/1/331.full.pdf>
- [7] Hama, K., Fumio N. A stereoscope observation of tracheal epithelium of mouse by means of the high voltage electron microscope; 1970.
- [8] Pavelka M, Ronge HR, Stockinger G. Vergleichende Untersuchungen am Trachealepithel verschiedener Säuger. *Acta Anat (Basel)* 1976;94:262–82.
- [9] Hansell MM, Moretti RL. Ultrastructure of the mouse tracheal epithelium. *J. Morphol.* 1969;128:159–69.
- [10] Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G, Widdicombe JG. The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell Tissue Res.* 1980;208:65–84.
- [11] Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G. The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. *J. Anat.* 1981;132:71–84.
- [12] Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am. J. Pathol.* 2004;164:577–88.

- [13] Lauweryns JM, van Ranst L, Verhofstad AA. Ultrastructural localization of serotonin in the intrapulmonary neuroepithelial bodies of neonatal rabbits by use of immunoelectron microscopy. *Cell Tissue Res.* 1986;243:455–9.
- [14] van Lommel A, Bollé T, Fannes W, Lauweryns JM. The pulmonary neuroendocrine system: the past decade. *Arch. Histol. Cytol.* 1999;62:1–16.
- [15] Tizzano M, Cristofolletti M, Sbarbati A, Finger TE. Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC Pulm Med* 2011;11:3.
- [16] Okamura H, Sugai N, Ohtani I. Identification of nasal epithelial cells with carbonic anhydrase activity. *Brain Res.* 1996;728:263–6.
- [17] Julius D, Clapham DE. Annual review of physiology: Annual Reviews; 2007.
- [18] Marshall WF, Nonaka S. Cilia: tuning in to the cell's antenna. *Curr. Biol.* 2006;16:R604-14.
- [19] Salathe M. Regulation of mammalian ciliary beating. *Annu. Rev. Physiol.* 2007;69:401–22.
- [20] Ibañez-Tallon I, Heintz N, Omran H. To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum. Mol. Genet.* 2003;12 Spec No 1:R27-35.
- [21] Margulis L, Bermudes D. Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. *Symbiosis* 1985;1:101–24.
- [22] Cavalier-Smith T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002;52:297–354.
- [23] D.J. Smith, E.A. Gaffney, J.R. Blake. *Modelling mucociliary clearance*: Elsevier.
- [24] Sanderson MJ, Dirksen ER. A versatile and quantitative computer-assisted photoelectronic technique used for the analysis of ciliary beat cycles. *Cell Motil.* 1985;5:267–92.
- [25] Chilvers MA, Rutman A, O'Callaghan C. Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003;112:518–24.
- [26] de Jongh, R U, Rutland J. Ciliary defects in healthy subjects, bronchiectasis, and primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995;151:1559–67.
- [27] Satir P, Matsuoka T. Splitting the ciliary axoneme: implications for a "switch-point" model of dynein arm activity in ciliary motion. *Cell Motil. Cytoskeleton* 1989;14:345–58.

- [28] Gibbons IR. The relationship between the fine structure and direction of beat in gill cilia of a lamellibranch mollusc. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;11:179–205.
- [29] Sleight MA. Ciliary function in transport of mucus. *Eur J Respir Dis Suppl* 1983;128 (Pt 1):287–92.
- [30] Gheber L, Priel Z. Synchronization between beating cilia. *Biophys. J.* 1989;55:183–91.
- [31] Kilgour E, Rankin N, Ryan S, Pack R. Mucociliary function deteriorates in the clinical range of inspired air temperature and humidity. *Intensive Care Med* 2004;30:1491–4.
- [32] Kienast K, Riechelmann H, Knorst M, Haffner B, Müller-Quernheim J, Schellenberg J et al. Combined exposures of human ciliated cells to different concentrations of sulfur dioxide and nitrogen dioxide. *Eur. J. Med. Res.* 1996;1:533–6.
- [33] Whitten ST, García-Moreno E B, Hilser VJ. Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102:4282–7.
- [34] Casey JR, Grinstein S, Orlowski J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;11:50–61. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.025>
- [35] Roos A, Boron WF. *Intracellular pH*. Bethesda, Md: The American Physiological Society; 1981.
- [36] Sperelakis N. *Cell physiology source book*. 2nd ed. San Diego, London: Academic Press; 1998.
- [37] Missner A, Kügler P, Saparov SM, Sommer K, Mathai JC, Zeidel ML et al. Carbon dioxide transport through membranes. *J. Biol. Chem.* 2008;283:25340–7.
- [38] Grinstein S, Furuya W, Biggar WD. Cytoplasmic pH regulation in normal and abnormal neutrophils. Role of superoxide generation and Na⁺/H⁺ exchange. *J. Biol. Chem.* 1986;261:512–4.
- [39] Shin JM, Munson K, Vagin O, Sachs G. The gastric HK-ATPase: structure, function, and inhibition. *Pflugers Arch.* 2009;457:609–22.

- [40] Brown D, Paunescu TG, Breton S, Marshansky V. Regulation of the V-ATPase in kidney epithelial cells: dual role in acid-base homeostasis and vesicle trafficking. *J. Exp. Biol.* 2009;212:1762–72.
- [41] Orlowski J, Grinstein S. Emerging roles of alkali cation/proton exchangers in organellar homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology* 2007;19:483–92.
- [42] Brett CL. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *AJP: Cell Physiology* 2005;288:C223.
- [43] Aronson PS. Kinetic properties of the plasma membrane Na^+ - H^+ exchanger. *Annu. Rev. Physiol.* 1985;47:545–60.
- [44] Fuster D, Moe OW, Hilgemann DW. Steady-state function of the ubiquitous mammalian Na/H exchanger (NHE1) in relation to dimer coupling models with $2\text{Na}/2\text{H}$ stoichiometry. *J. Gen. Physiol.* 2008;132:465–80.
- [45] Kinsella JL, Heller P, Froehlich JP. Na^+/H^+ exchanger: proton modifier site regulation of activity. *Biochem. Cell Biol.* 1998;76:743–9.
- [46] Otsu K, Kinsella JL, Koh E, Froehlich JP. Proton dependence of the partial reactions of the sodium-proton exchanger in renal brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 1992;267:8089–96.
- [47] Cuello F, Snabaitis AK, Cohen MS, Taunton J, Avkiran M. Evidence for direct regulation of myocardial Na^+/H^+ exchanger isoform 1 phosphorylation and activity by 90-kDa ribosomal S6 kinase (RSK): effects of the novel and specific RSK inhibitor fmk on responses to α 1-adrenergic stimulation. *Mol. Pharmacol.* 2007;71:799–806.
- [48] Khaled AR, Moor AN, Li A, Kim K, Ferris DK, Muegge K et al. Trophic factor withdrawal: p38 mitogen-activated protein kinase activates NHE1, which induces intracellular alkalinization. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21:7545–57.
- [49] Malo ME, Li L, Fliegel L. Mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the Na^+/H^+ exchanger is mediated through phosphorylation of amino acids Ser770 and Ser771. *J. Biol. Chem.* 2007;282:6292–9.
- [50] Takahashi E, Abe J, Gallis B, Aebersold R, Spring DJ, Krebs EG et al. p90(RSK) is a serum-stimulated Na^+/H^+ exchanger isoform-1 kinase. Regulatory phosphorylation of serine 703 of Na^+/H^+ exchanger isoform-1. *J. Biol. Chem.* 1999;274:20206–14.

- [51] Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch.* 2004;447:619–28.
- [52] Vandenberg JI, Metcalfe JC, Grace AA. Mechanisms of pHi recovery after global ischemia in the perfused heart. *Circulation Research* 1993;72:993–1003.
- [53] Cordat E, Casey JR. Bicarbonate transport in cell physiology and disease. *Biochem. J.* 2009;417:423–39.
- [54] Gross E, Hawkins K, Abuladze N, Pushkin A, Cotton CU, Hopfer U et al. The stoichiometry of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBC1 is cell-type dependent. *J. Physiol. (Lond.)* 2001;531:597–603.
- [55] Randell SH, Boucher RC. Effective mucus clearance is essential for respiratory health. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2006;35:20–8.
- [56] Alper SL. Molecular physiology and genetics of Na⁺-independent SLC4 anion exchangers. *J. Exp. Biol.* 2009;212:1672–83.
- [57] Mason DA, Goldfarb DS. The nuclear transport machinery as a regulator of Drosophila development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2009;20:582–9.
- [58] Paroutis P, Touret N, Grinstein S. The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology (Bethesda)* 2004;19:207–15.
- [59] Kane PM. The long physiological reach of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007;39:415–21.
- [60] Ishida Y, Nayak S, Mindell JA, Grabe M. A model of lysosomal pH regulation. *J. Gen. Physiol.* 2013;141:705–20.
- [61] Weisz OA. Organelle acidification and disease. *Traffic* 2003;4:57–64.
- [62] Jentsch TJ. CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2008;43:3–36.
- [63] Di A, Brown ME, Deriy LV, Li C, Szeto FL, Chen Y et al. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat. Cell Biol.* 2006;8:933–44.
- [64] Abad, María F Cano, Di Benedetto G, Magalhães PJ, Filippin L, Pozzan T. Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant. *J. Biol. Chem.* 2004;279:11521–9.

- [65] Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins: The National Academy of Sciences.
- [66] Brierley GP, Baysal K, Jung DW. Cation transport systems in mitochondria: Na⁺ and K⁺ uniports and exchangers. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1994;26:519–26.
- [67] Crompton M, Heid I. The cycling of calcium, sodium, and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 1978;91:599–608.
- [68] Garlid KD, Sun X, Paucek P, Woldegiorgis G. Mitochondrial cation transport systems. *Meth. Enzymol.* 1995;260:331–48.
- [69] Hoepfner D, Schildknecht D, Braakman I, Philippsen P, Tabak HF. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 2005;122:85–95.
- [70] Titorenko VI, Rachubinski RA. Spatiotemporal dynamics of the ER-derived peroxisomal endomembrane system. *Int Rev Cell Mol Biol* 2009;272:191–244.
- [71] Reddy JK, Mannaerts GP. Peroxisomal lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 1994;14:343–70.
- [72] Lechtreck K, Sanderson MJ, Witman GB. High-speed digital imaging of ependymal cilia in the murine brain. *Methods Cell Biol.* 2009;91:255–64.
- [73] Shinohara H, Asano T, Kato K, Kameshima T, Semba R. Localization of a G protein Gi2 in the cilia of rat ependyma, oviduct and trachea. *Eur. J. Neurosci.* 1998;10:699–707.
- [74] Zarsky HA. Novel RING Finger Protein OIP1 Binds to Conserved Amino Acid Repeats in Sperm Tail Protein ODF1. *Biology of Reproduction* 2002;68:543–52.
- [75] Fox CA, Meldrum SJ, Watson BW. Continuous measurement by radio-telemetry of vaginal pH during human coitus. *J. Reprod. Fertil.* 1982;33:69–75.
- [76] Maas DHA, Reiss G & Braun D. pH, pCO₂, and lactate concentration in human uterine fluid; 1983.
- [77] Iritani A, Nishikawa Y, Gomes WR, VanDemark NL. Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in rabbits. *J. Anim. Sci.* 1971;33:829–35.
- [78] Weström L, Mårdh PA, Mecklenburg CV, Håkansson CH. Studies on ciliated epithelia of the human genital tract. II. The mucociliary wave pattern of fallopian tube epithelium. *Fertil. Steril.* 1977;28:955–61.
- [79] Yamaoka S. [Cilium movement of human oviduct]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1987;39:777–84.

- [80] Paltieli Y, Weichselbaum A, Hoffman N, Eibschitz I, Kam Z. Laser scattering instrument for real time in-vivo measurement of ciliary activity in human fallopian tubes. *Hum. Reprod.* 1995;10:1638–41.
- [81] Carr DW, Acott TS. Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. *Biol. Reprod.* 1989;41:907–20.
- [82] Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H, Sugita Y. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 1985;260:9699–705.
- [83] Newcombe N, Clulow J, Man SY, Jones RC. pH and bicarbonate in the ductuli efferentes testis of the rat. *Int. J. Androl.* 2000;23:46–50.
- [84] Pérez-Fígares JM, Jimenez AJ, Rodríguez EM. Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microsc. Res. Tech.* 2001;52:591–607.
- [85] Davson H, Segal MB. *Physiology of the CSF and blood-brain barriers.* Boca Raton: CRC Press; 1996.
- [86] Lechtreck K, Delmotte P, Robinson ML, Sanderson MJ, Witman GB. Mutations in Hydin impair ciliary motility in mice. *J. Cell Biol.* 2008;180:633–43.
- [87] O’Callaghan, Chris, Sikand, Kulvinder, Chilvers, Mark. Analysis of ependymal ciliary beat pattern and beat frequency using high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *BioMed Central Ltd* 2012 Jun 7.
- [88] Cunniffe JG, Whitby-Strevens S, Wilcox MH. Effect of pH changes in cerebrospinal fluid specimens on bacterial survival and antigen test results. *J. Clin. Pathol.* 1996;49:249–53.
- [89] King M, Gilboa A, Meyer FA, Silberberg A. On the transport of mucus and its rheologic simulants in ciliated systems. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1974;110:740–5.
- [90] Gray J. *The mechanism of ciliary movement.* London: [s.n.]; 1922.
- [91] Guerrin F, Robin H, Lequien P, Lambert P. PH métrie bronchique in situ. Effets d'une acidose métabolique. *J. Physiol. (Paris)* 1970;62 Suppl 2:282.
- [92] Karnad DR, Mhaisekar DG, Morawar KV. Respiratory mucus pH in tracheostomized intensive care unit patients: Effects of colonization and pneumonia. *Crit. Care Med.* 1990;18:699–701.

- [93] Buhrmeister CC. A study of the hydrogen-ion concentration, nitrogen content and viscosity of nasal secretions. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 1933;27:778–88.
- [94] Luk CK, Dulfano MJ. Effect of pH, viscosity and ionic-strength changes on ciliary beating frequency of human bronchial explants. *Clin. Sci.* 1983;64:449–51.
- [95] Holma B. Influence of buffer capacity and pH-dependent rheological properties of respiratory mucus on health effects due to acidic pollution. *Sci. Total Environ.* 1985;41:101–23.
- [96] Guerrin F, Robin H, Lambert P, Kine A. pH métrie bronchique in situ. Effets de l'hypoxie-hypercapnie. *J. Physiol. (Paris)* 1969;61 Suppl 2:305–6.
- [97] Clary-Meinesz C, Mouroux J, Huitorel P, Cosson J, Schoevaert D, Blaive B. Ciliary beat frequency in human bronchi and bronchioles. *Chest* 1997;111:692–7.
- [98] Clary-Meinesz C, Mouroux J, Cosson J, Huitorel P, Blaive B. Influence of external pH on ciliary beat frequency in human bronchi and bronchioles. *Eur. Respir. J.* 1998;11:330–3.
- [99] Sutto Z, Conner GE, Salathe M. Regulation of human airway ciliary beat frequency by intracellular pH. *J. Physiol. (Lond.)* 2004;560:519–32.
- [100] Loffing J, Kaissling B. Sodium and calcium transport pathways along the mammalian distal nephron: from rabbit to human. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003;284:F628-43.
- [101] Perazella MA. Trimethoprim is a potassium-sparing diuretic like amiloride and causes hyperkalemia in high-risk patients. *Am J Ther* 1997;4:343–8.
- [102] Hulter HN, Licht JH, Glynn RD, Sebastian A, Ilnicki LP. Pathophysiology of chronic renal tubular acidosis induced by administration of amiloride. *J. Lab. Clin. Med.* 1980;95:637–53.
- [103] Carr MJ, Gover TD, Weinreich D, Undem BJ. Inhibition of mechanical activation of guinea-pig airway afferent neurons by amiloride analogues. *Br. J. Pharmacol.* 2001;133:1255–62.
- [104] Yoshizumi M, Kitagawa T, Masuda Y, Hori T, Kawahito T, Chikugo F et al. [Effect of amiloride on the early and late stage of postischemic recovery in

- isolated perfused rat hearts--possible involvement of Na^+/H^+ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange]. *Nihon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1996;44:1735–41.
- [105] Jessen F, Sjöholm C, Hoffmann EK. Identification of the anion exchange protein of Ehrlich cells: a kinetic analysis of the inhibitory effects of 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene-disulfonic acid (DIDS) and labeling of membrane proteins with 3H-DIDS. *J. Membr. Biol.* 1986;92:195–205.
- [106] Zhao Y, Baltz JM. Bicarbonate/chloride exchange and intracellular pH throughout preimplantation mouse embryo development. *Am. J. Physiol.* 1996;271:C1512-20.
- [107] Kienast K, Riechelmann H, Knorst M, Schlegel J, Müller-Quernheim J, Schellenberg J et al. An experimental model for the exposure of human ciliated cells to sulfur dioxide at different concentrations. *Clin Investig* 1994;72:215–9.
- [108] Kanno Y, Loewenstein WR. Low-Resistance Coupling between Gland Cells. Some Observations on intercellular Contact Membranes and intercellular Space. *Nature* 1964;201:194–5.
- [109] Lawrence TS, Beers WH, Gilula NB. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature* 1978;272:501–6.
- [110] Sotkis A, Wang XG, Yasumura T, Peracchia LL, Persechini A, Rash JE et al. Calmodulin colocalizes with connexins and plays a direct role in gap junction channel gating. *Cell Communication and Adhesion* 2001;8:277-+.
- [111] White RL, Doeller JE, Verselis VK, Wittenberg BA. Gap junctional conductance between pairs of ventricular myocytes is modulated synergistically by H^+ and Ca^{++} . *Journal of General Physiology* 1990 Jun;95:1061–75.
- [112] Peracchia C. Chemical gating of gap junction channels Roles of calcium, pH and, calmodulin. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004;1662:61–80.
- [113] Stergiopoulos K, Alvarado JL, Mastroianni M, Ek-Vitorin JF, Taffet SM, Delmar M. Hetero-domain interactions as a mechanism for the regulation of connexin channels. *Circulation Research* 1999;84:1144–55.
- [114] Sanderson MJ, Charles AC, Boitano S, Dirksen ER. Mechanisms and function of intercellular calcium signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1994;98:173–87.

- [115] Dunlap K, Takeda K, Brehm P. Activation of a calcium-dependent photoprotein by chemical signalling through gap junctions. *Nature* 1987;325:60–2.
- [116] Sandberg K, Bor M, Ji H, Markwick A, Millan MA, Catt KJ. Angiotensin II-induced calcium mobilization in oocytes by signal transfer through gap junctions. *Science* 1990;249:298–301.
- [117] Eggenschwiler JT, Anderson KV. Cilia and developmental signaling. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* 2007;23:345–73.
- [118] Winters, Scot L. [Author, Reprint Author, Davis CW, Boucher RC. Mechanosensitivity of mouse tracheal ciliary beat frequency: roles for Ca²⁺, purinergic signaling, tonicity, and viscosity. *American Journal of Physiology Lung Cellular & Molecular Physiology* 2007;292:L614-L624. Available from: URL:<http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00288.2005>.
- [119] Seybold ZV, Mariassy AT, Stroh D, Kim CS, Gazeroglu H, Wanner A. Mucociliary interaction in vitro: effects of physiological and inflammatory stimuli. *J. Appl. Physiol.* 1990;68:1421–6.
- [120] Thomas RC. Experimental displacement of intracellular pH and the mechanism of its subsequent recovery. *J. Physiol. (Lond.)* 1984;354:3P-22P.
- [121] Willumsen NJ, Boucher RC. Intracellular pH and its relationship to regulation of ion transport in normal and cystic fibrosis human nasal epithelia. *J. Physiol. (Lond.)* 1992;455:247–69.
- [122] Paradiso AM, Coakley RD, Boucher RC. Polarized distribution of HCO₃⁻ transport in human normal and cystic fibrosis nasal epithelia. *J. Physiol. (Lond.)* 2003;548:203–18.
- [123] Wyatt TA, Forget MA, Adams JM, Sisson JH. Both cAMP and cGMP are required for maximal ciliary beat stimulation in a cell-free model of bovine ciliary axonemes. *American Journal of Physiology-Lung cellular and molecular Physiology* 2005;288:L546-L551.
- [124] Schmid A, Bai G, Schmid N, Zaccolo M, Ostrowski LE, Conner GE et al. Real-time analysis of cAMP-mediated regulation of ciliary motility in single primary human airway epithelial cells. *J. Cell. Sci.* 2006;119:4176–86.

- [125] Zhang L, Sanderson, Michael J. The role of cGMP in the regulation of rabbit airway ciliary beat frequency. *Journal of Physiology (Cambridge)* 2003;551:765–76.
- [126] Schmid A, Sutto Z, Nlend M, Horvath G, Schmid N, Buck J et al. Soluble Adenylyl Cyclase Is Localized to Cilia and Contributes to Ciliary Beat Frequency Regulation via Production of cAMP. *The Journal of General Physiology* 2007;130:99–109.
- [127] Green J. Cytosolic pH regulation in osteoblasts. *Mineral & Electrolyte Metabolism* 1994;20:16–30.
- [128] Demarex N, Romanek RR, Orlowski J, Grinstein S. ATP dependence of Na^+/H^+ exchange: Nucleotide specificity and assessment of the role of phospholipids. *Journal of General Physiology* 1997;109:117–28.
- [129] NHE1 inhibition by amiloride- and benzoylguanidine-type compounds. Inhibitor binding loci deduced from chimeras of NHE1 homologues with endogenous differences in inhibitor sensitivity: American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc; 2007.
- [130] Alvarez BV, Villa-Abrille MC. Mitochondrial NHE1: a newly identified target to prevent heart disease. *Frontiers in Physiology* 2013;4:152.
- [131] Oriij R, Postmus J, Ter Beek A, Brul S, Smits GJ. In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology (Reading, Engl.)* 2009;155:268–78.
- [132] Santo-Domingo J, Demarex N. The renaissance of mitochondrial pH. *Journal of General Physiology* 2012;139:415–23.
- [133] Noel J, Roux D, Pouyssegur J. Differential localization of Na^+/H^+ exchanger isoforms (NHE1 and NHE3) in polarized epithelial cell lines. *J. Cell. Sci.* 1996;109 (Pt 5):929–39.
- [134] Barbar E, Kleinman B, Imhoff D, Li M, Hays TS, Hare M. Dimerization and folding of LC8, a highly conserved light chain of cytoplasmic dynein. *Biochemistry* 2001;40:1596–605.
- [135] Piperno G, Luck DJ. Axonemal adenosine triphosphatases from flagella of *Chlamydomonas reinhardtii*. Purification of two dyneins. *J. Biol. Chem.* 1979;254:3084–90.

- [136] Urner F, Sakkas D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* 2003;125:17–26.
- [137] Gibbons BH, Gibbons IR. Flagellar movement and adenosine triphosphatase activity in sea urchin sperm extracted with triton X-100. *J. Cell Biol.* 1972;54:75–97.
- [138] Brokaw CJ, Kamiya R. Bending patterns of *Chlamydomonas* flagella: IV. Mutants with defects in inner and outer dynein arms indicate differences in dynein arm function. *Cell Motil. Cytoskeleton* 1987;8:68–75.
- [139] Keskes L, Giroux-Widemann V, Serres C, Pignot-Paintrand I, Jouannet P, Feneux D. The reactivation of demembranated human spermatozoa lacking outer dynein arms is independent of pH. *Mol. Reprod. Dev.* 1998;49:416–25.
- [140] Xie F, Garcia MA, Carlson AE, Schuh SM, Babcock DF, Jaiswal BS et al. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev. Biol.* 2006;296:353–62.
- [141] Peaston MJ. Metabolic acidosis in burns. *British medical journal* 1968;1:809–11.
- [142] Efstratiadis G, Voulgaridou A, Nikiforou D, Kyventidis A, Kourkouni E, Vergoulas G. Rhabdomyolysis updated. *Hippokratia* 2007 Jul;11:129–37.
- [143] Innemee G, de Meijer, P H, Meinders AE. Metabole acidose ten gevolge van hyperalimentatie; een gevaarlijke complicatie bij parenterale voeding. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 1999;143:2006–9.
- [144] Bleic S, Backer D de, Deleuze M, Vachier JL, Vincent JL. Correction of metabolic acidosis in experimental CPR: a comparative study of sodium bicarbonate, carbicarb, and dextrose. *Annals of emergency medicine* 1991;20:235–8.
- [145] Kopple JD, Kalantar-Zadeh K, Mehrotra R. Risks of chronic metabolic acidosis in patients with chronic kidney disease. *Kidney international. Supplement* 2005:S21-7.
- [146] Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR et al. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 2000;289:625–8.

- [147] O'Grady NP, Murray PR, Ames N. Preventing ventilator-associated pneumonia: does the evidence support the practice? *Jama* 2012 Jun 20;307:2534–9.
- [148] L. Sachs, S. Weiterer, M.A. Weigand, M. Henrich, PO-3.6.5 Milrinon, Adrenalin und Noradrenalin steigern die Zilienschlagfrequenz und die Partikeltransportgeschwindigkeit des trachealen Flimmerepithels durch Kalzium, cAMP und Proteinkinase A abhängige Kaskaden, DAC 2013

10 Eigene Veröffentlichungen

Posterpräsentation und Abstract:

„Der Einfluss wechselnder pH-Werte auf die Leistungsfähigkeit des trachealen Flimmerepithels“; Johannes Reichwein; Sebastian Weiterer; Markus A. Weigand; Michael Henrich, Gießen, Deutscher Anästhesiecongress (2013), Nürnberg

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Henrich für die Überlassung des Themas, für das Erlernen des selbstständigen wissenschaftlichen Arbeitens sowie für die außerordentlich gute Betreuung meiner Doktorarbeit während der Zeit im Labor und dem anschließenden Schreiben der Dissertation. Mithilfe seiner Motivation, seines großen Engagements und seiner hilfreichen Hinweise schuf er die Voraussetzungen für diese Arbeit.

Großer Dank gebührt Herrn Dr. Sebastian Weiterer, der jederzeit für mich ansprechbar war, diese Dissertation sehr umfangreich betreut hat und stets konstruktive, ermutigende und anspornende Worte für mich fand.

Für die immer freundliche, unkomplizierte und hilfreiche Unterstützung im Labor der Abteilung Anästhesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Gießen von Prof. Dr. Markus A. Weigand bedanke ich mich bei Dr. Florian Uhle und Ilona Magel.

Allen „Mitdoktoranden“ möchte ich für die angenehme und unkomplizierte Zeit im Labor danken.

Meinen Freunden danke ich für den bedingungslosen Rückhalt, die ermutigenden Worte und dem Glauben an meine Person.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen der anästhesiologischen Abteilung des Klinikums Wetzlar, die aufgrund ihres reichen Erfahrungsschatzes sehr motivierend und anspornend für mich waren und sind.

Bei Katharina möchte ich mich für ihre Geduld, ihren Ansporn, Zuspruch, die zahllosen ermutigenden Worte und die liebevolle Begleitung bedanken.

Danken möchte ich vor allem meiner Mutter Hannelore, die mir das Studium der Medizin und meinen Werdegang überhaupt erst ermöglicht hat. Durch ihr grenzenloses Vertrauen, ihr immer offenes Ohr und ihre großartige Unterstützung ist alles erst möglich gewesen.

Danke!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6371-9



9 783835 196371